

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Carolina dos Santos

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE PRESERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DA ESPÉCIE *Saccharomyces kudriavzevii* PARA A PRODUÇÃO DE MATERIAL
DE REFERÊNCIA CERTIFICADO**

Rio de Janeiro

2022

Carolina dos Santos

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE PRESERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DA ESPÉCIE *Saccharomyces kudriavzevii* PARA A PRODUÇÃO DE MATERIAL
DE REFERÊNCIA CERTIFICADO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Maria Helena S. Villas Bôas

Verônica Viana Vieira

Carlos Roberto S. do Nascimento

Rio de Janeiro

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Catologação na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Santos, Carolina dos

Otimização da metodologia de preservação e caracterização da espécie *Saccharomyces kudriavzevii* para a produção de material de referência certificado. / Carolina dos Santos. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022. 111 f.: fig.; tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientadores: Maria Helena Simões Villas Bôas.
Verônica Viana Vieira.
Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento

1. Material de Referência Certificado. 2. *Saccharomyces kudriavzevii*. 3. Caracterização. 4. Controle de Qualidade. I. Título.

Optimization of the preservation methodology and characterization of the *Saccharomyces kudriavzevii* species to produce certified reference material.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Carolina dos Santos

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE PRESERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DA ESPÉCIE *Saccharomyces kudriavzevii* PARA A PRODUÇÃO DE MATERIAL
DE REFERÊNCIA CERTIFICADO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Luiz Lima Brandão (Doutor)

Fundação Oswaldo Cruz

Danielle Pereira Cavalcanti (Doutora)

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

Catia Aparecida Chaia de Miranda (Doutora)

Fundação Oswaldo Cruz

ORIENTADORES

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora)

Fundação Oswaldo Cruz

Verônica Viana Vieira (Doutora)

Fundação Oswaldo Cruz

Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento (Doutor)

Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Sem a presença de algumas pessoas ao meu lado não seria possível a realização desse trabalho, agradeço a Deus, por toda força, sabedoria e determinação dada a mim.

Ao programa da Pós- Graduação em Vigilância Sanitária por todo suporte.

Aos meus orientadores pela paciência, sabedoria e conforto durante a realização do trabalho.

À minha mãe Celia Cardoso por ter me incentivado a iniciar essa jornada.

À minha família e ao meu namorado Marcio pelo amor, incentivo e palavras de conforto nos momentos difíceis.

Ao meu grande amigo Paulo Proença pelos conselhos, força, incentivo e pela ajuda espiritual.

Ao Luã Cardoso e ao Kayo Bianco por toda paciência, ajuda e disponibilidade ao realizar os ensaios.

À toda equipe do Setor de Fungos, à equipe do Setor de Esterilização, à equipe do Setor de Meio de Cultura, Setor de Alimentos, Setor de Produtos Estéreis e a todos que de alguma forma participaram desse trabalho.

“Sou como a haste fina que qualquer brisa verga, mas nenhuma espada corta”

Maria Bethânia

RESUMO

A utilização de um Material de Referência Certificado (MRC) visa garantir a confiabilidade e a validade dos resultados de um laboratório, pois é um material caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica. Atualmente, no Brasil, não existem produtores acreditados de MRC de fungos e, como a aquisição depende de produtores internacionais, as dificuldades encontradas são devido ao alto custo de importação, além das barreiras sanitárias e comerciais. O desafio da produção de um MRC microbiológico é a sua instabilidade natural. A levedura *Saccharomyces kudriavzevii* é preconizada em testes de controle de qualidade em compêndios oficiais, além de ser estudada em vários campos da ciência e tecnologia. O objetivo deste trabalho foi otimizar a metodologia de preservação e caracterização inequívoca de *S. kudriavzevii* frente a outras espécies do gênero *Saccharomyces* para o estabelecimento dessa levedura como MRC, seguindo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017. Foram produzidos três lotes com crioprotetores diferentes: *Skim Milk* 20% + trealose 10%, *Skim Milk* 20% e *Skim Milk* 20% + maltose 10%, e avaliados quanto a sua homogeneidade e a estabilidade em longo e a curto prazo. Todos os três lotes foram considerados suficientemente homogêneos. Para a estabilidade em longo prazo os três lotes apresentaram prazo de validade de 12 meses. No teste de estabilidade a curto prazo o lote *Skim Milk* 20%, nas temperaturas de 4 °C e 35 °C, não foi considerado suficientemente estável. Já os lotes *Skim Milk* 20% + trealose 10% e *Skim Milk* 20% + maltose 10% apresentaram estabilidade apenas na temperatura de 4 °C. O lote selecionado para o estabelecimento do MRC da levedura *S. kudriavzevii* foi o produzido em *Skim Milk* 20% + maltose 10%. Na caracterização do MRC foram utilizadas técnicas fenotípicas e genotípicas, a fim de se ter uma caracterização da levedura *S. kudriavzevii*. As técnicas fenotípicas não foram suficientes para a diferenciação e identificação da levedura. A técnica genotípica de análise por HRM foi capaz de diferenciar as espécies estudadas e assim, identificar a levedura *S. kudriavzevii*, sendo assim, a técnica escolhida para a identificação do MRC. Foi elaborado um certificado que acompanha o MRC com todas as informações preconizadas na norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017, além das orientações dos guias ABNT ISO GUIA 31 e ABNT ISO GUIA 35. O estudo poderá colaborar com o aprimoramento da qualidade de produtos, atendendo as exigências do controle da qualidade, assim como, o desenvolvimento tecnológico da Fiocruz.

Palavras-chave: Material de Referência Certificado. *Saccharomyces kudriavzevii*. Caracterização. Controle de Qualidade

ABSTRACT

The use of a Certified Reference Material (CRM) aims to guarantee the reliability and validity of the results of a laboratory, as it is a material characterized by a metrologically valid procedure for one or more specified properties, accompanied by a certificate that provides the value of property, its associated uncertainty and a metrological traceability statement. Currently, in Brazil, there are no accredited producers of fungi CRM and, as the acquisition depends on international producers, the difficulties encountered are due to the high cost of importation, in addition to sanitary and commercial barriers. The challenge of producing a microbiological CRM is its natural instability. The yeast *Saccharomyces kudriavzevii* is recommended in quality control tests in official compendium, in addition to being studied in various fields of science and technology. The objective of this work was to optimize the methodology of preservation and unequivocal characterization of *S. kudriavzevii* against other species of the genus *Saccharomyces* for the establishment of this yeast as CRM, following the ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 standard. Three batches with different cryoprotectants were produced: Skim Milk 20% + trehalose 10%, Skim Milk 20% and Skim Milk 20% + maltose 10% and evaluated for their homogeneity and stability in long- and short-term. All three batches were considered sufficiently homogeneous. For long-term stability, the three lots had a shelf life of 12 months. In the short-term stability test, the Skim Milk 20% batch, at temperatures of 4 °C and 35 °C, was not considered sufficiently stable. The batches Skim Milk 20% + trehalose 10% and Skim Milk 20% + maltose 10% showed stability only at a temperature of 4 °C. The batch selected for the establishment of the *S. kudriavzevii* yeast CRM was produced in Skim Milk 20% + maltose 10%. In the characterization of the CRM, phenotypic and genotypic techniques were used, to have a characterization of the yeast *S. kudriavzevii*. Phenotypic techniques were not sufficient for yeast differentiation and identification. The genotypic technique of analysis by HRM was able to differentiate the studied species and thus, identify the yeast *S. kudriavzevii*, thus, the technique chosen for the identification of the CRM. A certificate was prepared that accompanies the CRM with all the information recommended in the ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 standard, in addition to the guidelines of the ABNT ISO GUIA 31 and ABNT ISO GUIA 35 guides. The study may collaborate with the improvement of the quality of products, meeting the requirements of quality control, as well as the technological development of Fiocruz.

Keywords: Certified Reference Material. *Saccharomyces kudriavzevii*. Characterization. Quality Control

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Cepas de <i>Saccharomyces</i> spp. e de outras espécies utilizadas para os métodos de identificação aplicados no presente estudo.....	32
Figura 1. Curvas de <i>melting</i> formadas para os dois pares de iniciadores.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados dos testes para determinação do valor a ser selecionado na escala McFarland para cada lote.....	48
Tabela 2	Dados dos três lotes produzidos de <i>S. kudriavzevii</i>	49
Tabela 3	Resultados das contagens obtidas nos testes de homogeneidade dos três lotes produzidos de <i>S. kudriavzevii</i>	50
Tabela 4	Parâmetros da Anova para a avaliação da homogeneidade dos três lotes de <i>S. kudriavzevii</i> produzidos.....	51
Tabela 5	Incerteza referente a homogeneidade de cada lote de <i>S. kudriavzevii</i> produzido.....	51
Tabela 6	Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em longo prazo do lote 091940001 (<i>Skim Milk</i> 20% + trealose 10%) de <i>S. kudriavzevii</i>	53
Tabela 7	Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em longo prazo do lote 101940001 (<i>Skim Milk</i> 20%) de <i>S. Kudriavzevii</i>	54
Tabela 8	Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em longo prazo do lote 121940001 (<i>Skim Milk</i> 20% + maltose 10%) de <i>S. kudriavzevii</i>	55
Tabela 9	Mediana dos valores obtidos em cada mês para cada lote (n= 3) de <i>S. kudriavzevii</i> produzido.....	56
Tabela 10	Resultados da regressão linear para análise da estabilidade em longo prazo dos três lotes de <i>S. kudriavzevii</i> produzidos.....	57
Tabela 11	Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em curto prazo do lote 091940001 produzido em <i>Skim Milk</i> 20% e trealose 10%.....	59
Tabela 12	Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em curto prazo do lote 101940001 produzido em <i>Skim Milk</i> 20%.....	60
Tabela 13	Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em curto prazo do lote 121940001 produzido em <i>Skim Milk</i> 20% e maltose 10%.....	61
Tabela 14	Mediana dos valores obtidos em cada dia e temperatura de cada lote produzido de <i>S. kudriavzevii</i> em diferentes crioprotetores.....	62
Tabela 15	Resultados da regressão linear para análise da estabilidade em curto prazo dos três lotes de <i>S. kudriavzevii</i> produzidos.....	62

Tabela 16	Resultados da regressão linear para análise da estabilidade em curto prazo (5 dias) do lote <i>Skim Milk</i> 20%.....	63
Tabela 17	Resultados obtidos no teste não paramétrico Kruskal Wallis, valor de propriedade quantitativo e incerteza dos três lotes de <i>S. kudriavzevii</i>	64
Tabela 18	Aspectos macroscópicos, microscópicos, técnica de Dalmau e crescimento em meio de cultura líquido observados para as leveduras <i>Saccharomyces</i> spp. (n= 9) avaliadas neste estudo.....	66
Tabela 19	Avaliação fisiológica pelo sistema automatizado VITEK® 2 das leveduras <i>Saccharomyces</i> spp. (n= 9)	68
Tabela 20	Resultado da avaliação das cepas <i>Saccharomyces</i> spp. (n= 9) utilizadas no estudo por MALDI-TOF MS sem a etapa de extração.....	69
Tabela 21	Resultado da avaliação das cepas <i>Saccharomyces</i> spp. (n= 9) utilizadas no estudo por MALDI-TOF MS com a etapa de extração.....	70
Tabela 22	Temperaturas de <i>melting</i> , pela avaliação da técnica HRM, dos iniciadores ScH1 + ScH4 e ScH3 + ScH4 das cepas estudadas (n= 11).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise da Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
°C	grau Celsius
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CFRVS	Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária
CMA	Corn meal ágar
CRB	Centro de Recursos Biológicos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
F	Razão entre as variâncias entre e dentro dos frascos
g	Força G
H ₀	Hipótese nula
H ₁	Hipótese alternativa
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISHAM	<i>International Society for Human and Animal Mycology</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
MQ _{dentro}	Média Quadrática dentro dos frascos
MQ _{entre}	Média Quadrática entre os frascos
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
ng	nanograma
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
R ²	Coefficiente de Determinação

Rename	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
TBE	Tris-borato-EDTA
TVP	Teste de Viabilidade e Pureza
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volts
WI	<i>Westerdijk Fungal Biodiversity Institute</i>
WDCM	<i>World Data Center for Microorganisms</i>
WFCC	<i>World Federation for Culture Collections</i>
YMA	Ágar extrato de levedura-extrato de malte
YMB	Caldo extrato de levedura-extrato de malte
µL	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O gênero <i>Saccharomyces</i>	17
1.1.1 <i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	18
1.2 Importância no controle da qualidade	18
1.3 Material de Referência Certificado	19
1.3.1 Testes de homogeneidade e estabilidade	21
1.4 Caracterização do Material de Referência Certificado	22
1.4.1 Caracterização fenotípica de leveduras	22
1.4.1.2 <i>Caracterização molecular</i>	23
1.5 Métodos de preservação e agentes crioprotetores	25
1.6 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e a CFRVS	27
1.7 Centro de Recursos Biológicos (CRB) e o Biobanco	28
1.8 Justificativa	29
2 OBJETIVO	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 METODOLOGIA	32
3.1 Cepa utilizada para produção do MRC	32
3.1.1 Cepas para aplicação dos métodos de identificação	32
3.2 Produção do MRC	33
3.2.1 Rastreabilidade metrológica	33
3.2.2 Planejamento da produção do MRC	33
3.2.3 Valores de propriedade	33
3.2.4 Produção do lote estoque para trabalho.....	34
3.2.4.1 <i>Teste de viabilidade e pureza pré-fase de preservação (TVP-pré)</i>	34
3.2.4.2 <i>Teste de viabilidade e pureza pós-fase de preservação (TVP-pós)</i>	35
3.2.5 Definição do número de unidades formadoras de colônias.....	35
3.2.6 A escolha dos agentes crioprotetores	36
3.2.7 Produção dos lotes de <i>S. kudriavzevii</i> como MRC	36
3.2.8 Teste da homogeneidade.....	37
3.2.8.1 <i>Avaliação estatística do teste da homogeneidade</i>	38
3.2.9 Teste de estabilidade em longo prazo ou de armazenamento	38
3.2.9.1 <i>Avaliação estatística do teste de estabilidade em longo prazo</i>	39

3.2.10 Teste de estabilidade em curto prazo ou de transporte	39
3.2.10.1 Avaliação estatística do teste de estabilidade em curto prazo.....	40
3.2.11 Avaliação do valor de propriedade utilizando o teste não paramétrico de Kruskal Wallis.....	40
3.3 Caracterização taxonômica	41
3.3.1 Caracterização fenotípica.....	41
3.3.1.1 Avaliação dos aspectos macroscópicos.....	41
3.3.1.2 Avaliação dos aspectos microscópicos.....	41
3.3.1.3 Avaliação fisiológica.....	42
3.3.1.4 Avaliação por MALDI-TOF MS.....	42
3.3.2 Caracterização genotípica.....	44
3.3.2.1 Extração de DNA das leveduras.....	44
3.3.2.2 Análise de HRM.....	44
3.4 Elaboração do certificado.....	45
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Planejamento da produção.....	47
4.1.1 Atribuição do valor de propriedade.....	47
4.2 Produção dos lotes	49
4.3 Teste de homogeneidade	49
4.4 Teste de estabilidade em longo prazo.....	52
4.5 Teste de estabilidade em curto prazo.....	58
4.6 Avaliação do valor de propriedade utilizando o teste não paramétrico de Kruskal Wallis	64
4.7 Caracterização taxonômica	65
4.7.1 Caracterização fenotípica.....	65
4.7.1.1 Avaliação por MALDI-TOF MS.....	68
4.7.2 Caracterização genotípica.....	71
4.8 Certificado de análise do MRC	73
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÃO.....	79
7. PRODUTO TECNOLÓGICO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE A – PLANEJAMENTO DA PRODUÇÃO DE LOTE PILOTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO DO MICRO-ORGANISMO	

SACCHAROMYCES KUDRIAVZEVII CFRVS MRC 40001, COM SKIM MILK A 20% + TREALOSE 2% COMO CRIOPROTETOR.....	87
APÊNDICE B – PLANEJAMENTO DA PRODUÇÃO DE LOTE PILOTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO DO MICRO-ORGANISMO SACCHAROMYCES KUDRIAVZEVII CFRVS MRC 40001, COM SKIM MILK A 20% COMO CRIOPROTETOR.....	95
APÊNDICE C – PLANEJAMENTO DA PRODUÇÃO DE LOTE PILOTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO DO MICRO-ORGANISMO SACCHAROMYCES KUDRIAVZEVII CFRVS MRC 40001, COM SKIM MILK A 20% + MALTOSE 2% COMO CRIOPROTETOR.....	103
APÊNDICE D – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO MRC S. KUDRIAVZEVII LOTE 121940001.....	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Saccharomyces*

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* desempenham um papel importante em vários campos da ciência biológica. São utilizadas nos processos de fermentação em todo o mundo e destacam-se como modelo de organismos eucarióticos não só na bioquímica como também para genômica (MOHD AZHAR et al., 2017).

O gênero *Saccharomyces*, assim como suas diferentes espécies, é estudado por diversas áreas, como a produção de cerveja, vinho e na panificação. Esses estudos visam o melhoramento biotecnológico da levedura. Na produção do bioetanol é o micro-organismo mais utilizado atualmente, com isso, estudos também são realizados, a fim do melhor entendimento dos fatores que possam influenciar no processo (MOHD AZHAR et al., 2017; HEITMANN; ZANNINI; ARENDT, 2018).

Esse gênero possui reprodução nas formas assexuada e sexuada e suas características são distintas em cada caso. Na reprodução assexuada são formados brotamento multilateral, suas células podem ser globosas, elipsoidais ou cilíndricas, podendo formar pseudo-hifas. Na reprodução sexuada, os ascósporos são globosos a elipsoides curtos, com uma parede lisa e geralmente são produzidos de uma a quatro unidades em cada asco. Como principais características bioquímicas e fisiológicas essas leveduras apresentam boa fermentação, não produzem compostos do tipo amido e não possuem crescimento com o nitrato como única fonte de nitrogênio (KURTZMAN, 2011a).

O gênero *Saccharomyces* é composto por oito espécies, *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces paradoxus* e *Saccharomyces uvarum*, pertencentes à família Saccharomycetaceae, ordem Saccharomycetales, classe Saccharomycetes, subfilo Sacharomycotina e ao filo Ascomycota (MUIR; HARRISON; WHEALS, 2011; NAUMOV et al., 2000; VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

1.1.1 *Saccharomyces kudriavzevii*

Quando a Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), em 1988, adquiriu a cepa ATCC 2601, esta era classificada como *S. cerevisiae* com base em caracterizações taxonômicas tradicionais, mas com o avanço dos estudos e das técnicas de biologia molecular com a cepa, uma autenticação molecular identificou-a de forma convincente como *S. kudriavzevii* (NAUMOV et al., 2000).

No cultivo dessa levedura em meio ágar extrato de levedura-extrato de malte (YMA), após incubação de 48 h a 25 °C, são observadas colônias de cor creme, opaca, com superfície lisa geralmente plana, ocasionalmente elevada ou dobrada. No crescimento em caldo extrato de malte (YMB), após 48 h a 25°C, as células são ovoides, de 5 – 8 x 6 – 10 µm, isoladamente, em pares ou em grupos; o brotamento é multilateral e não há formação de película. Podem ser observadas a formação de pseudo-hifas limitadas em meio ágar de fubá de milho (CMA), pela técnica de *Dalmau Plate*, onde há baixa tensão de oxigênio. Os ascos são ovoides a alongados e podem ser observados em CMA, após incubação por semanas a 25 °C, apresentando quatro ascósporos esféricos (KURTZMAN, 2011b).

1.2 Importância no controle da qualidade

A levedura *S. kudriavzevii* ATCC 2601 é preconizada para o ensaio microbiológico do antibiótico nistatina na Farmacopeia Brasileira (2019) e na Farmacopeia Americana (2019). Além disso, é estabelecida para o controle de qualidade dos meios de cultura ágar antibiótico n° 12 e n° 19 (DIFCO; BBL, 2020).

A nistatina é um antifúngico da classe dos poliênicos, levemente hidrossolúvel. O seu mecanismo de ação se dá através da sua interação com o ergosterol existente na membrana celular dos fungos susceptíveis, aumentando a permeabilidade da membrana através da criação de poros. Tal desorganização aumenta a permeabilidade da membrana a prótons e cátions divalentes, resultando na morte celular (RANG et al., 2016).

Esse antifúngico é indicado para o tratamento da candidíase, doença causada pela levedura *Candida albicans*, localizada na cavidade bucal e no trato digestivo superior, denominada esofagite. Recém-nascidos e lactentes são pacientes mais vulneráveis a doença, assim como, indivíduos adultos, principalmente em casos de uso de próteses dentárias ou quando o organismo está enfraquecido por carências nutricionais, vitamínicas e nos casos de queda da imunidade como ocorre na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (RANG et al., 2016).

Este medicamento consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) na forma de suspensão oral de 100.000 UI/ mL, gel oral de 2% (20 mg/g) e loção a 2% (20 mg/g), por meio do Componente Básico da Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2020).

Já os meios de cultura ágar antibiótico n° 12 e n° 19 são recomendados para determinar a potência de antibióticos pela técnica de ensaio microbiológico (DIFCO; BBL, 2020).

1.3 Material de Referência Certificado

Materiais de referência (MR) e Materiais de Referência Certificado (MRC) visam garantir confiabilidade de métodos analíticos através da verificação de exatidão, sendo assim, importantes para a garantia de qualidade dos resultados de um laboratório. Atualmente, no Brasil, não existem produtores acreditados de MR e/ou MRC de leveduras e, para o seu uso, os laboratórios dependem de fornecedores internacionais. Para aquisição desses materiais microbiológicos as dificuldades encontradas são devido ao alto custo de importação, além das barreiras sanitárias e comerciais (ROSAS et al., 2019).

Um MR é um material suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas, que é suficientemente estabelecido para o seu uso em um processo de medição. Essas propriedades podem ser qualitativas ou quantitativas (ABNT, 2016).

O MRC é um MR, caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica (ABNT, 2012).

A rastreabilidade metrológica é a propriedade de um resultado de medição, pelo qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (INMETRO, 2012).

A importância advinda da rastreabilidade analítica, bem como a ampla gama de possibilidades de usos dos MRC, tais como, validações e calibrações, fazem do MRC uma peça-chave na garantia da qualidade de laboratórios e indústrias do Brasil (MOURA; COSTA, 2009; BICA et al., 2015).

Um candidato a produtor de um MRC deve seguir uma série de normas e guias publicados. A norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 apresenta as regras com as quais os MRC devem ser produzidos e disponibilizados, seguindo as orientações dos requisitos técnicos da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 (ABNT, 2017b, 2017c). Além dessas normas, seguem como orientações adicionais a ABNT ISO GUIA 30 – que descreve os termos e definições relacionados com materiais de referência (ABNT, 2016) e a ABNT ISO GUIA 35 – que fornece princípios estatísticos para auxiliar na compreensão e desenvolvimento de métodos válidos para atribuir valores às propriedades de um MR, incluindo a avaliação de suas incertezas associadas, e estabelecer sua rastreabilidade metrológica (ABNT, 2020) e a ABNT ISO GUIA 31 - que descreve o conteúdo dos certificados, rótulos e documentação associada do MRC (ABNT, 2017a).

Baseado nas normas e guias descritos anteriormente, para o estabelecimento de um MRC existem quatro etapas principais a serem cumpridas: o preparo do material, o que inclui o planejamento da produção; a verificação da homogeneidade; estabelecimento da estabilidade, o que garante a integridade do material durante o tempo de armazenamento estabelecido anteriormente; e a certificação dos valores de propriedades do material produzido. A embalagem e o rótulo também são características importantes no processo, pois vão garantir integridade ao longo do tempo e a rastreabilidade das informações, respectivamente (CARDOSO et al., 2010; ABNT, 2017a). Ainda, os conhecimentos de métodos estatísticos são utilizados nessas etapas, a fim de se ter as respostas matemáticas e conclusivas dos testes executados, garantindo assim as informações necessárias para a certificação do material (ABNT, 2020).

O desenvolvimento, produção e o uso de MRC em ensaios microbiológicos tem uma dificuldade a mais devido a questões relacionadas a estabilidade e viabilidade dos micro-organismos, sendo assim, um desafio para os possíveis produtores de MRC para esse fim. Contudo, esse produto é indispensável para o controle de qualidade em análises microbiológicas (JANNING, 1995; ROSAS et al., 2019).

1.3.1 Testes de homogeneidade e estabilidade

O primeiro teste a ser realizado após a produção de um lote de MR é o teste de homogeneidade. Este é necessário na certificação e demonstra que as unidades deste lote são suficientemente homogêneas entre si, sendo recomendada a realização do teste em condições de repetibilidade. O plano de amostragem pode ser aleatório, aleatório estratificado ou sistemático para a seleção dos frascos (ABNT, 2012). As características de cada modelo são apresentadas a seguir:

- Amostragem aleatória - aquela em que todos os elementos da população apresentam a mesma chance de serem escolhidos, sendo por isso, escolhidos por sorteio;
- amostragem sistemática - compreende a escolha dos elementos segundo um valor fixo que é determinado a partir da divisão do tamanho da população pelo tamanho da amostra;
- amostragem estratificada - quando a população está dividida em grupos para a realização do sorteio.

Conforme orientação do ABNT ISO GUIA 35, a estratificação é o método mais indicado para esses estudos (ABNT, 2020; ABNT, 2017c).

O estudo de estabilidade tem como objetivo avaliar o grau de instabilidade remanescente do MRC após a produção ou a confirmação da estabilidade do material e só pode ser realizado se for demonstrada homogeneidade suficiente do lote. Esta etapa ocorre sob duas condições específicas planejadas, que podem ser orientadas conforme descrito no ABNT ISO GUIA 35 (ABNT, 2020, ABNT, 2017c), são elas:

- condições de armazenamento (estabilidade em longo prazo);
- condições de transporte (estabilidade em curto prazo).

1.4 Caracterização do Material de Referência Certificado

A caracterização compreende a determinação de um ou mais valores de propriedades relevantes ao uso pretendido do MRC, sendo possível uma abordagem tanto quantitativa quanto qualitativa por meio do uso de procedimentos tecnicamente válidos. Um relatório de certificação detalhando o procedimento de execução e o próprio certificado, deve ser elaborado, após os testes para caracterização do material (ABNT, 2016; ABNT, 2017a).

1.4.1 Caracterização fenotípica de leveduras

1.4.1.1 *Caracterização morfológica*

Características fenotípicas como os aspectos macroscópicos (cor, textura, aspecto e margem) e microscópicos (brotamento, forma celular, agrupamento, dimensões e pesquisa de ascósporos) são importantes para a identificação e certificação da pureza de qualquer levedura e devem ser observadas antes e após cada etapa de trabalho (KURTZMAN, 2011b).

A identificação de leveduras usando métodos convencionais é demorada, dispendiosa e trabalhosa (AUBERTINE et al., 2006), com isso vários métodos são desenvolvidos a fim de facilitar a identificação. O Sistema Vitek[®] 2 é um método comercial, automatizado, que permite a identificação de leveduras, por meio da assimilação de açúcares presente nos poços do Cartão Vitek[®] 2 YST ID. O crescimento do micro-organismo é determinado espectrofotometricamente (INFORMAÇÃO, 2008).

1.4.2 Caracterização pelo método *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS é uma tecnologia que aborda a análise proteômica microbiana. Esse método é rápido, de baixo custo, simples e aplicável para

inúmeros micro-organismos, incluindo bactérias, arqueias e fungos (SCHUBERT; KOSTRZEWA, 2017). A capacidade dessa técnica de diferenciar a nível de espécies foi útil na descrição de novas espécies (LAY JR., 2001; CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

Uma das desvantagens desta tecnologia, é que a análise é dependente de bancos de dados. No entanto, há a possibilidade da criação e/ou customização de bancos próprios com a variedade infinita de isolados sem a necessidade da licença destes bancos (COSTA et al., 2021). Outra desvantagem é quanto a dificuldade de análise de micro-organismos com parede celular espessa como no caso de alguns fungos filamentosos, bacilos Gram-positivos esporulados e micobactérias (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011; MOREIRA et al., 2021, 2022). No entanto, pode-se aplicar protocolo de extração com objetivo de otimizar a extração de proteínas e melhorar a qualidade da identificação (COSTA et al., 2021).

No caso do gênero *Saccharomyces*, Quintilla et al. (2018) conseguiram diferenciar sete espécies pelo método MALDI-TOF MS, são elas: *Saccharomyces arboricolus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e *S. eubayanus*.

Pequenas diferenças entre algumas espécies dificultam a identificação e a separação dos grupos no espectro de massas do MALDI-TOF MS, como exemplo *S. cariocanus* que difere de *S. paradoxus* por apenas quatro translocações (LITI; BARTON; LOUIS, 2006).

Uma alternativa para a melhor caracterização por MALDI-TOF MS das diferentes espécies de *Saccharomyces* é a utilização de diferentes meios de cultura e diferentes temperaturas de incubação, já que cada condição estabelecida influenciará o perfil de espectros de massas obtidos na análise, visto que esse método consegue detectar modificações bioquímicas, de acordo com condições diferenciadas de cultivo (LAY, 2001).

1.4..2 Caracterização molecular

A amplificação das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal é um método rápido, preciso, de fácil execução, que permite a análise da variação em diferentes níveis taxonômicos, possibilitando a diferenciação de

espécies ou variedades de uma mesma espécie de leveduras (IRINYI et al., 2016).

Segundo Souto (2018), apenas essa metodologia não foi suficiente para a caracterização e diferenciação inequívoca entre as espécies de *Saccharomyces*, as mesmas estudadas no presente trabalho, pelo fato da similaridade molecular das leveduras, com isso, uma alternativa possível a esse método é a análise de dissociação de alta resolução (HRM, do inglês *High Resolution Melting*).

A técnica de HRM se baseia na análise de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com a adição de um agente fluorescente intercalante de DNA, esse corante se intercala na dupla fita de DNA e emite fluorescência. Quanto maior for a amplificação do fragmento estudado, maior será a fluorescência, devido ao maior número de duplas fitas do DNA formadas. Com o aumento da temperatura, as duplas fitas formadas vão se dissociar e gerar um decaimento da curva de fluorescência que será captado pelo leitor do equipamento, gerando curvas de *melting* de acordo com os diferentes genótipos (REED et al., 2007; HERRMAN et al., 2007; NADAI et al., 2018).

Estes corantes apresentam baixa toxicidade para a reação, podendo, portanto, ser utilizados em concentrações elevadas a fim de saturar toda a dupla cadeia de DNA das amostras. Isso significa, que os sinais de fluorescência medidos têm maior fidelidade (sensibilidade e resolução), aparentemente devido à menor proporção de redistribuição de corante das regiões desnaturadas para aquelas ainda em dupla cadeia. As diferenças da composição de bases do DNA podem ser detectadas e comparadas através da curva e temperatura de *melting* (T_m). A análise dos dados é realizada com uso de um *software* específico (REED et al., 2007; HERRMAN et al., 2007).

A técnica pode ser utilizada para diferentes finalidades, podendo ser qualitativa, por exemplo, a análise de alterações genéticas, mapeamento do DNA e determinação da taxa de mutações somáticas adquiridas; e quantitativa, como na análise de metilação do DNA e na quantificação de carga viral. Com isso, pode ser aplicada em diversas áreas da pesquisa científica como nos estudos de associação, identificação de espécies, determinação da prevalência do alelo dentro de uma população ou subgrupos e rastreamento de mutações (TOMAZ; SANTOS; SANTOS, 2015).

Além da sua ampla utilização, a técnica de HRM é rápida, robusta, simples, não necessita da utilização da eletroforese, de sondas de iniciadores, nenhum processamento depois da PCR e ainda reduz a possibilidade de contaminação. Contudo, algumas limitações são observadas, como a utilização de pequenos fragmentos e a presença de alterações genéticas no DNA, que podem dificultar a diferenciação ou outras variantes genéticas do fragmento amplificado, que podem gerar erros de interpretação da curva em análise (TOMAZ; SANTOS; SANTOS, 2015).

A análise de HRM de genes ribossômicos ou outros genes altamente conservados tem sido usada extensivamente para identificar micro-organismos em nível de espécie (LIN et al., 2011).

1.5 Métodos de preservação e agentes crioprotetores

A manutenção adequada dos micro-organismos permite a sua utilização em diferentes momentos em uma linha de pesquisa ou ainda na rotina de um laboratório. A escolha de um método de preservação ideal deve ser baseada nas características do micro-organismo em estudo, e pelas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível, assim como nas condições estruturais e financeiras do laboratório (COSTA; FERREIRA, 1991).

Os métodos de preservação de micro-organismos podem ser classificados de acordo com o tempo, sendo assim:

- Curto prazo: repique contínuo;
- Médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a -20 °C;
- Longo prazo: liofilização, criopreservação.

Entre os métodos de preservação, podemos citar a liofilização, que consiste no congelamento e desidratação das células, em atmosfera a vácuo. E a criopreservação, que compreende a manutenção de materiais a temperaturas ultrabaixas (-80 °C em *ultrafreezers* e -150 °C a -196 °C em contêineres de nitrogênio líquido) (COSTA et al., 2009).

O método de liofilização apesar de ser considerado o mais eficiente para a manutenção do micro-organismo, é capaz de causar danos celulares como alterações na permeabilidade da membrana celular, o que leva ao aumento da sensibilidade a alguns agentes seletivos, aumento da fase *lag* de multiplicação celular e a necessidade de incremento nutricional (MORGAN et al., 2006).

Para solucionar o possível dano a célula, são utilizadas substâncias capazes de proteger a célula, chamadas de agentes crioprotetores, que reduzem o estresse físico e químico derivado do congelamento e do degelo das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem abranger baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (LIMA, 2011).

Alguns açúcares mostraram ser capazes de evitar os danos causados pela desidratação celular, devido ao processo de congelamento, por meio da estabilização da bicamada lipídica. Alguns autores discutem que açúcares como a sacarose e a trealose estabilizam a bicamada de fosfolipídios, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e a manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água (CROWE; CROWE; CARPENTER, 1987; WOELDERS et al., 1997).

A trealose é um agente crioprotetor natural, presente em células de plantas e leveduras. É um dissacarídeo que apresenta duas moléculas de água em sua fórmula química (HUBÁLEK, 2003). Existem modelos que explicam o efeito de proteção da trealose na membrana da célula de levedura durante os processos de desidratação - hidratação e congelamento - descongelamento. O modelo mais aceito é o proposto por Crowe et al. (1984), no qual a trealose interage com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana. A trealose substituiria a água que está ligada às cabeças polares dos fosfolipídios quando em condições favoráveis e seria perdida no processo de estresse. Com a ligação da trealose à membrana não há alteração do espaçamento entre os fosfolipídios, evitando assim as separações laterais dos componentes da membrana. Com a substituição das moléculas de água pela trealose não há passagem da fase fluida para a fase gel da membrana, mantendo-se a integridade e a fluidez da membrana, e assim, a viabilidade celular.

A descrição do mecanismo da maltose, um dissacarídeo como a trealose e a sacarose, como crioprotetor se explica, de uma forma geral, já que os açúcares não são capazes de se difundir através da membrana plasmática, pois atuam criando uma pressão osmótica que induz a desidratação celular, portanto, agem como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico, e conduzindo a uma baixa incidência de formação de cristais de gelo dentro da célula. Também elevam a sobrevivência de espécies no processo de criopreservação, pois podem exercer a função de solutos reduzindo o ponto de congelamento e minimizando a formação de gelo extracelular (LIMA, 2011). Outro fator muito relevante ao uso de açúcares como crioprotetores, é que normalmente esses aditivos apresentam baixa ou nenhuma toxicidade, mesmo adicionados em grande quantidade aos materiais biológicos (CROWE; CROWE; CARPENTER, 1987).

1.6 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e a CFRVS

O INCQS é uma unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) que atua em áreas de ensino, de pesquisa e de tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. Age em estreita cooperação com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), com Secretarias estaduais e municipais de Saúde, entre outros parceiros (INCQS, 2022).

As Coleções de Culturas são centros de preservação e de recursos genéticos e tem a função de manter organismos de interesse para estudos científicos e aplicações tecnológicas, onde os pesquisadores possam ter acesso a um material de qualidade para o desenvolvimento de novos conhecimentos e tecnologias (ÇAKTÜ; TÜRKOGLU, 2011).

A CFRVS do INCQS está registrada no *World Federation for Culture Collections* (WFCC) sob o número WDCM-1159. Além das cepas adquiridas de outras coleções, ainda presta serviços de identificação e depósito de cepas de clientes internos e externos e fornece cepas internamente para ensaios de controle de qualidade realizados no INCQS (FIOCRUZ, 2022).

1.7 Centro de Recursos Biológicos (CRB) e o Biobanco

Os CRB têm como objetivo fornecer material biológico, seguindo a alta qualidade exigida pela comunidade científica mundial. Funcionam também como coleções de serviços que disponibilizam material microbiológico certificado, atendendo requisitos de qualidade nacionais e internacionais, como a segurança e rastreabilidade. Todos os materiais fornecidos possuem como o alvo as áreas de pesquisa e desenvolvimento. O plano do CRB brasileiro se baseia nas normas da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e descreve como suas funções (FIOCRUZ, 2022b):

- Preservar e fornecer recursos biológicos (com qualidade assegurada) para Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) e aplicações nos setores científicos, industriais, de agronegócios, ambiente e saúde;
- Desenvolver P&D com estes recursos biológicos;
- Conservar a biodiversidade;
- Atuar como repositórios de material biológico de referência;
- Prestar serviços de depósito de material biológico, inclusive para proteção da propriedade intelectual.

A Fiocruz é responsável pela área da saúde no contexto da Rede Brasileira de CRB (Rede CRB-Br). Essa rede é de responsabilidade do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação e financiada pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT). Ainda participam do projeto de consolidação da Rede CRB-Br a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI), o Centro de Referência em informação Ambiental (CRIA), e a Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM). O objetivo é a consolidação da infraestrutura da Rede CRB-Br, visando atender as demandas por material biológico autenticado e certificado e serviços especializados de forma a promover a inovação tecnológica no país (FIOCRUZ, 2022b).

Um conceito mais amplo, além da definição clássica que se refere a materiais biológicos humanos, foi dado aos biobancos com a publicação da ABNT NBR ISO 20387:2020, onde biobanco define-se como uma entidade legal, ou parte dela, que realiza processo de aquisição e armazenamento, junto a algumas ou a todas as atividades relacionadas à coleta, preparação, preservação, ensaio, análise e distribuição de materiais biológicos definidos, assim como informações e dados associados. Ainda segundo esta Norma, materiais biológicos podem ser qualquer substância derivada, ou parcialmente obtida, de uma entidade orgânica como, humana, animal, planta, micro-organismo (s), ou organismo (s) multicelular (es) (ABNT, 2020)

Devido ao cenário atual da pandemia de Covid-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, o Ministério da Saúde liberou um aporte financeiro para a construção do Biobanco Covid-19 da Fiocruz (BC19-Fiocruz). O BC19-Fiocruz foi inaugurado em dezembro de 2021 e integrará o projeto CRB-Saúde. Inicialmente serão armazenados vírus SARS-CoV-2 e suas variantes, assim como, material biológico humano relacionados à Covid-19. Com o fim da pandemia, o BC19-Fiocruz será ampliado para o depósito de outros vírus, bactérias, fungos, protozoários, além de material biológico humano relacionados a outras doenças (FIOCRUZ, 2022c).

1.8 Justificativa

O estabelecimento de *S. kudriavzevii* como MRC irá contribuir para a saúde pública no Brasil, visto que é utilizado não só no controle de qualidade de produtos, como também no controle de qualidade de procedimentos laboratoriais, já que os órgãos fiscalizadores exigem cada vez mais esses materiais.

A tese de doutorado elaborada por Souto (2018), intitulada “Estabelecimento de Fungos como Materiais de Referência Certificados e Seleção de Métodos de Excelência para Caracterização das Diferentes Espécies” foi realizada também no Setor de Fungos do Departamento de Microbiologia do INCQS, e teve como seu objetivo principal estabelecer um MRC para diferentes leveduras, envolvendo ainda a escolha de um método que possibilitasse a melhor caracterização qualitativa (identidade) dessas leveduras,

entre elas, *S. kudriavzevii*. Devido à falta de estabilidade a longo prazo do material produzido de *S. kudriavzevii*, o MRC não pode ser estabelecido, além disso, a metodologia utilizada para a caracterização não foi satisfatória, por isso, o presente estudo visou o aprimoramento da técnica da produção e caracterização dessa levedura, para o estabelecimento do MRC.

O atual estudo será de suma importância para o desenvolvimento na área da produção industrial brasileira e para a saúde pública, como também para a área de Vigilância Sanitária, uma vez que no Brasil não existe um produtor de MRC de leveduras, o que dificulta a aquisição desse material devido as barreiras sanitárias e burocráticas do processo de importação, tornando um processo de compra de alto custo, além disso, não há muitos produtores internacionais disponíveis. Assim como, o desenvolvimento tecnológico da Fiocruz.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Otimizar a metodologia de preservação e caracterização inequívoca de *S. kudriavzevii* frente a outras espécies do gênero *Saccharomyces* para o estabelecimento dessa levedura como MRC.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar o planejamento para produção dos MRC;
- Produzir lotes candidatos a MRC utilizando três diferentes crioprotetores;
- Avaliar a homogeneidade e a estabilidade dos materiais produzidos;
- Caracterizar *S. kudriavzevii* por métodos fenotípicos e genotípicos;
- Certificar os valores de propriedade atribuídos aos materiais produzidos; assim como suas incertezas associadas, seguindo as orientações do guia ABNT ISO GUIA 35:2020;
- Elaborar o certificado do lote estabelecido como MRC.

3 METODOLOGIA

3.1 Cepa utilizada para produção do MRC

A cepa de *S. kudriavzevii* ATCC 2601, proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC), foi selecionada para o estabelecimento do MRC.

3.1.1 Cepas para aplicação dos métodos de identificação

Para testar os métodos de identificação das diferentes espécies *Saccharomyces* spp., foram utilizadas nove cepas oriundas da ATCC e da *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) do *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (WI) depositadas na CFRVS/Fiocruz (**Quadro 1**). As cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* foram utilizadas como controle negativo na metodologia de HRM.

Quadro 1. Cepas de *Saccharomyces* spp. e outras espécies utilizadas para os métodos de identificação aplicados neste estudo

Levedura	Nº de acesso CFRVS	Origem	Isolamento
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	CFRVS 40001	ATCC 2601	Sem informação
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40002	ATCC 9763	Ambiental
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40003	ATCC 9080	Sem informação
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40083	ATCC 4124	Ambiental
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40125	ATCC 36375	Ambiental
<i>Saccharomyces uvarum</i>	CFRVS 40088	ATCC 36376	Ambiental
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	CFRVS 40090	ATCC 2366	Ambiental
<i>Saccharomyces bayanus</i> ou <i>pastorianus</i>	CFRVS 40235	CBS 679	Ambiental
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	CFRVS 40302	ATCC 26602	Ambiental
<i>Candida krusei</i>	CFRVS 40147	ATCC 6258	Clínica
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40044	ATCC 3205	Ambiental

Legenda: CFRVS – Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária, ATCC - *American Type Culture Collection*, CBS - *Centraalbureau voor Schimmelcultures*.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

3.2 Produção do MRC

3.2.1 Rastreabilidade de processos

A fim de se ter a rastreabilidade dos processos é necessário que se registre todos os materiais, equipamentos e vidrarias utilizados em todo processo de produção do MRC, contribuindo para o cálculo da incerteza de medição, e para isso, foram adaptados os formulários de Souto (2018) para cada etapa descrita a seguir (INMETRO, 2012).

3.2.2 Planejamento da produção do MRC

O planejamento dos processos que possam interferir na qualidade da produção é a primeira etapa para o estabelecimento de um MRC. Os parâmetros que devem ser seguidos e controlados para a produção do MRC, foram: seleção do material; verificação da identidade do material; escolha e validação dos procedimentos de medição; verificação e calibração dos equipamentos de medição; especificação dos critérios de aceitação para homogeneidade e estabilidade; atribuição de valores de propriedade; estabelecimento de planilhas de incerteza e estimativa de incertezas dos valores certificados; definição de critérios de aceitação; estabelecimento da rastreabilidade metrológica dos resultados de medição e valores certificados; emissão de documentação; garantia de instalações e condições de armazenamento adequadas; garantia de rotulagem e embalagem apropriadas; garantia de condições de transporte apropriadas; garantia de monitoramento da estabilidade pós-produção e garantia de um serviço de pós-distribuição adequado para os usuários (ABNT, 2017c).

3.2.3 Valores de propriedade

De acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 devem ser definidos valores de propriedade ao MRC que será produzido, sendo assim para o MRC proposto neste trabalho, dois valores de propriedade foram atribuídos, um quantitativo, que compreende ao número de unidades formadoras de colônia (UFC) por alíquota de 100 μ L após a liofilização, e outro qualitativo, que abrange a identidade do micro-organismo (ABNT, 2017c).

3.2.4 Produção do lote estoque para trabalho

A levedura *S. kudriavzevii* utilizada para a produção do MRC, assim como as leveduras de outras espécies de *Saccharomyces* utilizadas para a etapa de identificação e as cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* para o controle negativo, foram armazenadas por meio da criopreservação, utilizando glicerol (CRQ, São Paulo, Brasil) 15% como crioprotetor, em criotubos armazenados em nitrogênio líquido. Para isso, ampolas liofilizadas, dessas cepas, foram abertas e reconstituídas com aproximadamente 0,5 mL de água purificada estéril e o conteúdo foi transferido para meio YMA (NEOGEN, Lansing, EUA), que foi incubado a (25 ± 2) °C por aproximadamente 48 h. Após esse período, 4 mL de solução de glicerol a 15% foram adicionados ao cultivo, e aproximadamente 0,5 mL dessa suspensão foi distribuída em cada criotubo.

Os criotubos foram transferidos para refrigerador a (4 ± 2) °C por aproximadamente 30 min, posteriormente para congelador a (-20 ± 2) °C por cerca de 20 min, em seguida transferidos para o *ultrafreezer* (Thermo Scientific, modelo forma 900 series) a -80 °C por cerca de 90 min e por último foram estocados no *container* de nitrogênio líquido na temperatura de cerca de -196 °C (SMITH; ONIONS, 1983; DAY; STACEY, 2007).

Estes lotes foram submetidos aos testes de viabilidade e pureza (TVP) no momento do congelamento (TVP-pré) e após 7 dias do congelamento das cepas (TVP-pós).

3.2.4.1 Teste de viabilidade e pureza pré-fase de preservação (TVP-pré)

A partir da suspensão a ser preservada, uma gota foi inoculada pelo método de esgotamento em uma placa de Petri contendo YMA, para avaliação da pureza, as colônias deveriam ter aspecto único e homogêneo, com as características compatíveis com a literatura (KURTZMAN, 2011b).

Para o teste de viabilidade, diluições seriadas, a partir da suspensão a ser preservada, foram realizadas em água estéril até a concentração de 10^{-6} . Da diluição 10^{-6} foram retiradas três alíquotas de 0,1 mL que foram inoculadas cada

uma em uma placa de Petri contendo YMA, e o espalhamento do inóculo foi realizado pelo método *spread plate*, com o auxílio da alça de Drigalski.

Todas as placas foram incubadas a (25 ± 2) °C por 48 h para posterior verificação das características coloniais e contagem das UFC por microlitro (UFC/ μ L) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

3.2.4.2 Teste de viabilidade e pureza pós-fase de preservação (TVP-pós)

Um criotubo foi escolhido aleatoriamente para verificação da pureza e da viabilidade, após 7 dias da produção do lote estoque para trabalho. O teste de pureza foi realizado conforme descrito anteriormente (item 3.2.4.1), assim como o teste de viabilidade, no entanto, as alíquotas da diluição 10^{-5} foram inoculadas nas três placas contendo YMA.

3.2.5 Definição do número de unidades formadoras de colônias

O método desenvolvido por Souto (2018) foi utilizado para alcançar uma recuperação de até 100 UFC por alíquota de 100 μ L após o processo de liofilização do material.

Após o descongelamento, uma alíquota de 100 μ L da cultura estoque foi inoculada em 9,9 mL de caldo YMB (NEOGEN, Lansing, EUA), e o tubo foi homogeneizado e incubado a (25 ± 2) °C por 48 h. Alíquotas de 1 mL da cultura foram centrifugadas (Eppendorf, Centrifuge 5415R, Merck, Darmstadt, Alemanha) a 12.204 g durante 1 min a 4 °C e foram realizadas duas lavagens sucessivas com água purificada. Posteriormente o sobrenadante foi descartado, a fim de retirar resíduos do meio de cultivo e para concentrar as células (SILVA et al., 2021).

O aparelho *DensiChekTMVitek[®]* (bioMérieux) foi utilizado para determinar a turvação previamente estabelecida a partir das células que foram ressuspensas em água purificada, onde uma concentração de células em torno de 10^6 UFC/mL foi determinada e a partir dessa concentração diluições foram realizadas já no crioprotetor. Considerando que há um declínio de duas casas logarítmicas após a liofilização de leveduras, e conforme a rotina da CFRVS, o resultado previsto é de até 100 UFC (SOUTO, 2018).

3.2.6 A escolha dos agentes crioprotetores

De acordo com a literatura encontrada para a levedura *S. kudriavzevii*, os agentes crioprotetores que foram utilizados no presente estudo foram os açúcares: trealose e maltose, ambos na concentração de 10%, juntamente com o crioprotetor *Skim Milk* a 20%, como já é padronizado na CFRVS, para todos os micro-organismos da coleção (BLANQUET et al., 2005).

Foram preparadas as soluções para a produção de três diferentes lotes, utilizando-se: *Skim Milk* (Difco, New Jersey, EUA) na concentração de 20%, *Skim Milk* 20% adicionado de trealose (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na concentração final de 10% e *Skim Milk* 20% adicionado de maltose (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na concentração final de 10%.

3.2.7 Produção dos lotes de *S. kudriavzevii* como MRC

Foram produzidos três lotes de MRC, um lote apenas com o *Skim Milk* a 20%, um novo lote com *Skim Milk* a 20% com adição da trealose a 10% e por último, um lote com *Skim Milk* a 20% adicionado de maltose 10%, cada um contendo 200 unidades. O método foi realizado a partir da metodologia descrita por Souto (2018).

O preparo da suspensão foi realizado conforme descrito no item 3.2.5, utilizando-se a diluição definida. A última diluição, ou seja, a suspensão a ser liofilizada, foi preparada em um frasco erlenmeyer estéril, e foi mantida em agitação em um banho de gelo durante todo o processo de envase e foram transferidas alíquotas de 0,6 mL para cada um dos 200 frascos de vidro estéreis com capacidade de 1,5 mL dispostos em estantes, numeradas, próprias do liofilizador, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson Marlow, modelo 323Dz).

Ao final do envase, uma alíquota de 0,1 mL foi retirada para realizar o teste de pureza e de viabilidade da suspensão antes da liofilização.

Após o envase, tampas de borracha estéreis foram encaixadas nos frascos de modo que ficassem entreabertas e as estantes foram mantidas em

recipientes plásticos, devidamente higienizados com álcool etílico a 70%, tampados e armazenados em *ultrafreezer* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante (20 ± 2) h.

Após esse período, antes de transferir o material, o liofilizador (Liotop, modelo K105, São Paulo, Brasil) foi ligado por aproximadamente 1 h para estabilização da temperatura, então os recipientes foram retirados do *ultrafreezer* e as estantes com os frascos posicionadas nas bandejas do liofilizador, e o material foi submetido a um ciclo de liofilização de no mínimo 24 h. Ao término do ciclo de liofilização, os frascos foram fechados sob condições de vácuo, utilizando-se o sistema de vedação manual acoplado ao aparelho.

O vácuo foi testado utilizando pistola de descarga elétrica (Edwards, modelo ST200K, Suécia), em local com pouca luminosidade. Os frascos com vácuo foram então lacrados com tampas de metal, com o auxílio de uma recravadeira, e rotulados com etiquetas que possuem as informações: nome da cepa, o número de registro na CFRVS, o número do lote e a ordem de envase.

Os frascos foram armazenados em *freezer* a $(-20 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$, uma vez que essa condição reproduz a realidade da maioria dos laboratórios.

3.2.8 Teste da homogeneidade

Dez frascos dos lotes preparados, foram selecionados por amostragem aleatória. Segundo a ABNT (2012), o número mínimo de frascos selecionados aleatoriamente deve incluir entre dez a 30 unidades, porém, não se recomenda que seja menor que 10 e essa é a primeira avaliação estatística que deve ser realizada durante o estabelecimento de um MRC.

Com o auxílio de uma micropipeta, os líofilos foram reidratados com aproximadamente 0,6 mL de água purificada estéril, a suspensão foi homogeneizada suavemente e mantida em repouso por 30 min a $(25 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse período, a suspensão foi homogeneizada com auxílio de agitador de tubos e alíquotas de 100 μL foram inoculadas em cinco placas de Petri contendo o meio de cultura YMA. O inóculo foi espalhado por toda superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a $(25 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após este período, a pureza e o número de UFC foram verificados. Em todos os testes referentes aos MRC, cinco alíquotas contidas

nos frascos foram avaliadas, para garantir que em cada uma delas sejam recuperadas até 100 UFC da levedura (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

3.2.8.1 Avaliação estatística do teste da homogeneidade

Para a avaliação da homogeneidade foi realizada análise da variância (Anova) de fator único, utilizando o programa Microsoft Excel 2013. A homogeneidade do lote foi interpretada pelo parâmetro F. Para que os lotes produzidos sejam suficientemente homogêneos, o $F_{\text{calculado}}$ deve ser menor quando comparado ao $F_{\text{crítico}}$. Outro parâmetro importante para a homogeneidade do lote é a incerteza (u), que foi calculada segundo a expressão:

$$S_{bb} = \sqrt{(MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}) / n}$$

Onde o desvio padrão entre e dentro dos frascos “ S_{bb} ” corresponde ao desvio padrão entre (MQ_{entre}) e dentro (MQ_{dentro}) dos frascos e “ n ” o número de replicatas,

Com os dados gerados foi calculada a incerteza relativa à homogeneidade, que foi utilizada no processo de certificação do MR (ABNT, 2012).

3.2.9 Teste de estabilidade em longo prazo ou de armazenamento

Caso os lotes produzidos se apresentem suficientemente homogêneos, foi realizado, então, o teste de estabilidade em longo prazo. O estudo de estabilidade clássico foi utilizado, onde amostras individuais são preparadas ao mesmo tempo (mesma batelada), sob condições idênticas, sendo medidas em tempos separados (ABNT, 2020).

Três frascos foram avaliados para cada tempo (t), e os frascos utilizados foram selecionados por amostragem aleatória estratificada. Os testes foram realizados com a seguinte frequência: no 1º mês os ensaios foram realizados semanalmente; a partir do 2º mês até o 3º, quinzenalmente; e a partir do 4º mês, mensalmente, até um ano da produção do lote. Antes de iniciar o teste, os

frascos armazenados no *freezer* a (-20 ± 2) °C foram retirados e mantidos a aproximadamente 25 °C durante 30 min.

Os testes foram realizados de acordo com o descrito no item 3.2.8, onde apenas o que difere foi o número de frascos analisados. A pureza do material de cada frasco também foi avaliada.

3.2.9.1 Avaliação estatística do teste de estabilidade em longo prazo

Para avaliar se os valores obtidos no estudo apresentavam alguma tendência ao longo do tempo, foi realizada a avaliação estatística dos resultados por meio da análise de regressão linear pelo programa Microsoft Excel 2013, conforme estabelece a ABNT ISO GUIA 35 (ABNT, 2020). A mediana foi utilizada para todos os testes estatísticos pois ela não é sensível a outliers quando comparada com a média, portanto para que essa avaliação fosse realizada, a mediana foi calculada para cada dia em cada lote.

O coeficiente de determinação (R^2) varia entre 0 e 1, onde espera-se que o valor fique o mais próximo do zero, indicando menor probabilidade de correlação do tempo com o número de UFC, ou seja, o material se apresentará suficientemente estável.

Já com a avaliação do F de significação, é possível afirmar que se esse parâmetro for menor que o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$), a regressão é significativa, o que não é o objetivo deste estudo.

Quanto mais perto do zero for o coeficiente da variável X menor será a chance do número de UFC do material ter correlação com o tempo.

A hipótese nula indica que o tempo não influencia no número de UFC das alíquotas dentro dos frascos, sendo assim, se o valor-P for maior que o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$), não se rejeita a hipótese nula, demonstrando que não existe correlação significativa entre as variáveis.

Para o cálculo da incerteza o valor do erro padrão, encontrado pela análise de regressão linear do programa Microsoft Excel 2013, foi multiplicado pelo tempo da análise, que foram 12 meses.

3.2.10 Teste de estabilidade em curto prazo ou de transporte

A estabilidade em curto prazo avalia o efeito da temperatura sobre as propriedades do material em condições de transporte (ABNT, 2012). O modelo de estudo aplicado foi o isócrono, no qual amostras individuais foram preparadas ao mesmo tempo, sob condições idênticas, porém as medições são realizadas no mesmo experimento, ocorrendo, portanto, sob condições de repetibilidade (ABNT, 2020).

O teste foi realizado em temperaturas que simulem temperaturas de transporte, sendo selecionadas 4 °C e 35 °C (pior caso). Os frascos foram selecionados por amostragem aleatória estratificada em triplicata. A cada dia, três frascos foram transferidos do *freezer* a -20 °C para a temperatura proposta, ou seja, foram realizados dois diferentes testes (duas diferentes temperaturas) para cada lote produzido. Após 7 dias, os 21 frascos foram analisados juntos, sob as mesmas condições de análise. O teste foi realizado de acordo com o descrito no item 3.2.8.

3.2.10.1 Avaliação estatística do teste de estabilidade em curto prazo

A avaliação da estabilidade em curto prazo foi realizada como descrito no item 3.2.9.1, analisando a possibilidade de haver qualquer tendência nos dados obtidos no estudo, assim como o cálculo da incerteza (ABNT, 2020).

3.2.11 Avaliação do valor de propriedade utilizando o teste não paramétrico de Kruskal Wallis

Para a avaliação do valor de propriedade quantitativo foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com o objetivo de comparar os resultados de três analistas diferentes, e testar a possibilidade da interferência técnica no procedimento. Os testes foram realizados de acordo com o descrito no item 3.2.8, onde apenas o que difere foi o número de frascos analisados, nesse caso foram três frascos. Esse teste permite realizar a comparação de três ou mais grupos em amostras independentes.

Esse teste não está disponível no programa do Excel, sendo assim, foi utilizado um programa denominado JAMOVl para realizar o teste de Kruskal Wallis, disponível gratuitamente no site <https://jamovi.org>.

O que se espera do teste é que o p - valor seja maior que o nível de significância (0,05) para que a hipótese nula (três analistas diferentes possuem a mesma distribuição de UFC) não seja rejeitada, ou seja, a contagem das UFC não depende do analista que realizou o procedimento.

3.3 Caracterização taxonômica

Para a caracterização referente à identidade do micro-organismo, diferentes metodologias foram avaliadas por meio de um estudo com as cepas de diferentes espécies (mencionadas no item 3.1.1) do mesmo gênero do MRC.

O objetivo foi eleger uma metodologia eficaz, dentre os métodos fenotípicos e moleculares, que pudesse ser utilizada na caracterização das diferentes espécies selecionadas para permitir a confirmação da identidade de *S. kudriavzevii* inequivocamente. As cepas de todas as espécies (**Quadro 1**) foram analisadas mediante os aspectos macroscópicos e microscópicos, avaliações fisiológicas por meio do sistema automatizado VITEK® 2, MALDI-TOF MS e HRM.

3.3.1 Caracterização fenotípica

3.3.1.1 Avaliação dos aspectos macroscópicos

Para a observação das características coloniais como textura, cor, superfície, brilho e margem, um fragmento do crescimento fúngico foi estriado por esgotamento em placa contendo YMA, a placa foi incubada a (25 ± 2) °C por cerca de 48 h e após esse tempo, com auxílio do estereoscópio (Bausch & Lomb, modelo StereoKoom 5), as características foram observadas.

Para observação em caldo foram observados o crescimento, a formação de sedimento, película e anel. Para isso, um fragmento do crescimento fúngico foi inoculado em dois tubos contendo meio YMB, sendo um incubado a (25 ± 2) °C e o outro a (36 ± 1) °C com leitura após 2 e 3 dias (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

3.3.1.2 Avaliação dos aspectos microscópicos

A partir das culturas em YMB, ainda foram observados ao microscópio (Zeiss, modelo Scope. A1) aspectos, tais como: brotamento, forma celular, agrupamento e as dimensões. A pesquisa de ascósporos foi realizada pelo cultivo das cepas em ágar acetato, formulado, por até 30 dias, incubadas a (25 ± 2) °C. Após o período de incubação, fragmentos dos cultivos foram transferidos para lâminas microscópicas que foram coradas com verde malaquita (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 5% e contra coradas com fucsina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

3.3.1.3 Avaliação fisiológica

O sistema automatizado VITEK[®] 2 (bioMérieux) foi utilizado para a avaliação fisiológica, utilizando o cartão VITEK[®]2 YST ID (bioMérieux).

A partir de uma colônia isolada foi realizado o repique no meio YMA a (25 ± 2) °C por 24 h. A partir desse crescimento foi preparada uma suspensão com turvação ajustada ao valor padrão de 1,80 a 2,20 da escala de McFarland utilizando o *DensiChekTMVitek[®]2*. Essas suspensões foram preparadas em aproximadamente 2,5 mL de solução salina a 0,45% (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), em tubo plástico, específico para ser utilizado no sistema automatizado VITEK[®] 2 e transferidas para o cartão VITEK[®]2 YST ID, segundo as recomendações do fabricante.

3.3.1.4 Avaliação por MALDI-TOF MS

As análises com MALDI-TOF MS foram realizadas em colaboração com Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fiocruz.

Para a construção dos espectros, cultivos foram obtidos a partir do crescimento das leveduras no meio de cultura YMA e incubados por cerca de 48 h. Cada cepa foi analisada em duplicata.

Para isso, como os fungos apresentam parede celular espessa, primeiramente foi realizada a extração em um microtubo de 1,5 mL de capacidade, como recomendado pelo fabricante do equipamento, onde foram adicionados 300 µL de água Milli-Q e foi preparada uma suspensão com adição de cinco a dez colônias pequenas. Com o auxílio de um agitador de tubos, a

suspensão foi homogeneizada por 15 s. Em seguida, foram adicionados 900 μL de etanol 99% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), e o microtubo foi homogeneizado por mais 15 s, seguido de uma centrifugação em velocidade 15.700 g por 2 min. Após esse período, o etanol foi decantado e novamente o microtubo foi centrifugado na mesma velocidade por 1 min. Após a centrifugação, todo o excesso de etanol foi evaporado com a tampa do microtubo aberta, a temperatura ambiente. Após o completo processo de evaporação, foram adicionados 50 μL de ácido fórmico 70% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Em seguida, após homogeneização, foram adicionados 50 μL de acetonitrila 100% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), e o microtubo foi homogeneizado e levado à centrífuga em velocidade 15.700 g, por 2 min. Logo após, 1 μL do sobrenadante foi levado para a placa de leitura (*Target Plate*) e seco em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 μL da matriz HCCA (Bruker, Massachusetts, EUA) e novamente o microtubo foi deixado em repouso até a completa secagem.

Após o preparo e a secagem à temperatura ambiente das placas de leitura, estas foram introduzidas no equipamento MALDI Biotyper (MALDI-TOF/MS, Bruker, Massachusetts, EUA) e feixes de luz ultravioleta (UV) foram emitidos sobre cada depósito, com isso a matriz absorve energia do laser e com a evaporação da amostra, os íons com massas diferentes foram liberados. Na análise, os íons menores chegam mais rapidamente ao detector, assim o tempo de voo de cada partícula é utilizado para calcular sua massa. A soma de íons analisados forma o espectro de massa da cepa analisada (CARBONNELLE; NASSIF, 2011). Os perfis de espectros de massa foram analisados por comparação com os espectros disponíveis no banco de dados do equipamento, e posteriormente todos os espectros gerados a partir de micro-organismos não incluídos no banco, foram adicionados ao banco de dados pelo *software Flex Analysis* versão 3.4.

Os testes foram realizados por dois analistas diferentes. Segundo Souto (2018), os resultados com a utilização do ácido fórmico foram melhores quando comparados aos das amostras que não receberam o ácido fórmico na placa, com isso, o ácido fórmico foi utilizado em todas as análises.

Os valores de *score* fornecidos pelo equipamento são classificados como alta identificação (2.00 – 3.00), representado pela cor verde; baixa identificação (1.70 – 1,99), na cor amarela e não identificado (0.00 – 1,69), na cor vermelha.

3.3.2 Caracterização genotípica

3.3.2.1 *Extração de DNA*

Duas alças de massa celular crescidas em YMA foram retiradas e transferidas para um microtubo que foi armazenado a -20 ± 2 °C por cerca de 24 h. Após esse tempo, foram adicionados 500 µL de tampão de lise [0,5 g dodecil sulfato de sódio (SDS); 1,4 g NaCl; 0,73 g ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 20 mL Tris-HCl 1M; água q.s.p. 100 mL] (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e 5 µL de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Com o auxílio de um agitador de tubos, o microtubo foi homogeneizado durante 1 min, e incubado a 65 °C por 1 h. Após a incubação, foram adicionados 500 µL de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (v/v/v 25:24:1) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e o microtubo foi homogeneizado por aproximadamente 2 min, a fim de se obter uma suspensão homogênea. Em seguida, o microtubo foi centrifugado a 15.700 g durante 15 min a 4 °C. Após esse tempo, a parte aquosa superior foi transferida para outro microtubo e foi adicionado volume igual de isopropanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), e o conteúdo foi homogeneizado lentamente. O microtubo foi armazenado a -20 ± 2 °C por uma noite. Após esse período, o microtubo foi levado à centrifugação a 15.700 g durante 15 min. O isopropanol foi descartado e uma massa foi observada ao fundo do tubo. Foram adicionados 500 µL de etanol a 70% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e o conteúdo homogeneizado de forma lenta. Em seguida, nova centrifugação foi realizada com as mesmas condições de velocidade e tempo. O sobrenadante, em seguida, foi descartado e o precipitado depositado foi seco à temperatura ambiente. Após a secagem, o DNA foi hidratado com 50 µL de água purificada estéril e estocado a 4 °C. A quantificação foi realizada por meio do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) (FERRER et al., 2001).

3.3.2.2 *Análise de HRM*

Para a caracterização genotípica foi utilizada a técnica de HRM, com isso, foi realizada a reação de PCR em tempo real com a adição de um corante

fluorescente, nesse caso, foi utilizado o EvaGreen (Solis BioDyne, Tartu, Estônia).

Os iniciadores utilizados foram desenhados segundo descrito por Nadai et al. (2018), são eles:

Iniciador ScH1: F: 5'-CCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGA-3'

Iniciador ScH3: F: 5'-GTGCCCTCTGCTCCTTGTGG-3'

Iniciador ScH4: R: R: 5'-CCACAGGCTATAATACTTACCG-3'

Nadai et al. (2018) demonstraram que dois pares ScH1 + ScH4 e ScH3 + ScH4 tiveram melhores resultados na diferenciação das espécies de *Sacharomyces*, por esse motivo, esses pares foram definidos para o presente trabalho. O equipamento QuantStudio 7 Flex (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) gerou as curvas de dissociação para cada par de iniciadores, indicando a temperatura de *melting*, onde metade do produto da PCR está dissociado e a outra metade está hibridado. O procedimento foi realizado segundo Nardi et al. (2006) com adaptações. Para a amplificação do material, as amostras foram incubadas a 95 °C por 12 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 15 s para desnaturação da fita, e 60 °C por 20 s para o anelamento dos iniciadores e extensão da nova fita. Cada reação foi preparada com volume final de 20 µL, composta por MasterMix (5X) (Solis BioDyne, Tartu, Estônia) iniciador 1 (ScH1+ ScH4), iniciador 2 (ScH3+ ScH4) (Metabion, Planegg, Alemanha), ambos na concentração de 10 pmol/µL e água livre de DNase/RNase.

A curva de *melting* foi obtida através dos seguintes passos: a aquisição de dados foi realizada para cada aumento de 0,2 °C na temperatura, com uma etapa de 10 s, com a temperatura variando de 65 a 95 °C.

3.4 Elaboração do certificado

O certificado do MRC foi elaborado conforme as orientações da ABNT ISO GUIA 31. O conteúdo do certificado incluiu: o título do documento; identificador unívoco do MRC; nome do MRC; nome e detalhes de contato do produtor do

MR; uso pretendido; período de validade; informações sobre armazenamento; instruções para manuseio e uso que sejam suficientes para assegurar a integridade do material, numeração de página e o número total de páginas; versão do documento; descrição do MRC; propriedade de interesse, valor de propriedade e incerteza associada; rastreabilidade metrológica e nome e função do profissional responsável pela aprovação (ABNT, 2017a).

A incerteza do MRC foi calculada seguindo as orientações do ABNT ISO Guia 35 (2020), esse guia recomenda que a incerteza do MRC considere todas as incertezas encontradas nos testes executados, a homogeneidade, a estabilidade em longo e curto prazo e a caracterização, pois todas são importantes e interferem no processo.

Com isso, foi utilizada a expressão matemática abaixo:

$$U_{MRC} = \sqrt{u_{homog}^2 + u_{ELP}^2 + u_{ECP}^2 + u_{car}^2}$$

Define-se como, U_{MRC} a incerteza expandida do material, u_{homog} é a incerteza associada ao estudo de homogeneidade, u_{ELP} é a incerteza associada ao estudo de estabilidade em longo prazo, u_{ECP} se refere ao estudo de estabilidade em curto prazo e u_{car} é a incerteza referente à caracterização.

4 RESULTADOS

4.1 Planejamento da produção

A primeira etapa para o estabelecimento de um MRC é o planejamento da produção do lote, para isso, foram elaborados três documentos de “Planejamento da produção de lote piloto de Material de Referência Certificado” referentes aos diferentes lotes produzidos (**APÊNDICES A, B e C**).

4.1.1 Atribuição do valor de propriedade

Foi atribuído ao MRC o valor de propriedade quantitativo de até 100 UFC por alíquota de 0,1 mL do líofilo reidratado após a liofilização. Para isso, foram testadas diferentes diluições e as turvações correspondentes na escala de McFarland para cada crioprotetor.

Souto (2018) estabeleceu para a levedura *S. kudriavzevii* a turvação correspondente 0,8 da escala de McFarland e a diluição de 10^{-3} com o uso de *Skim Milk* a 20%. No presente estudo foram testadas as diluições correspondentes a 0,5 e 0,9 da escala de McFarland para os crioprotetores que não foram estudados anteriormente (*Skim Milk* 20% + trealose 10% e *Skim Milk* 20% + maltose 10%). Na turvação correspondente a 0,9 da escala de McFarland no crioprotetor *Skim Milk* 20% + trealose 10% foi obtido um número menor de UFC quando comparado ao número de UFC obtido na turvação 0,8. Por esse motivo, a turvação correspondente a 0,8 da escala de McFarland foi estabelecida para todos os lotes a serem produzidos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Resultados dos testes para determinação do valor a ser selecionado na escala McFarland para cada lote

Crioprotetor	Escala McFarland	Diluição	TVP-pré (UFC/100µL)	Frasco	Contagem (UFC/100µL)				
					Aliquota 1	Aliquota 2	Aliquota 3	Aliquota 4	Aliquota 5
Skim Milk 20%	0,8	10 ⁻³	1,52 x 10 ⁶	2	68	75	63	70	56
				3	46	48	57	53	47
	0,9	10 ⁻³	1,63 x 10 ⁶	10	55	87	65	79	72
				7	63	67	62	57	72
Skim Milk 20% + trealose 10%	0,5	10 ⁻³	9,03 x 10 ⁵	6	14	12	13	26	11
				5	13	8	14	12	12
	0,8	10 ⁻³	1,64 x 10 ⁶	2	31	35	31	32	35
				4	32	41	33	31	35
0,9	10 ⁻³	1,70 x 10 ⁶	2	18	23	26	25	29	
			6	28	26	27	28	26	
Skim Milk 20% + maltose 10%	0,5	10 ⁻³	9,37 x 10 ⁵	2	30	16	24	20	25
				9	24	13	24	17	25
	0,8	10 ⁻³	1,65 x 10 ⁶	4	35	31	46	42	43
				3	31	30	30	33	31
0,9	10 ⁻³	1,97 x 10 ⁶	5	48	51	55	51	56	
			3	50	48	49	59	56	

Legenda: TVP- Teste de Viabilidade e Pureza, UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL-microlitro.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

4.2 Produção dos lotes

Foram produzidos três lotes, com 200 unidades cada, os dados foram descritos na **tabela 2**. O lote foi identificado como sendo: os dois primeiros números correspondentes ao mês de produção, seguido do ano e o número da levedura *S. kudriavzevii* na CFRVS.

Tabela 2. Dados dos três lotes produzidos de *S. kudriavzevii*

Crioprotetor	Data da produção	Lote
<i>Skim Milk</i> 20%	06/09/2019	091940001
<i>Skim Milk</i> 20% + trealose 10%	25/10/2019	101940001
<i>Skim Milk</i> 20% + maltose 10%	20/12/2019	121940001

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Para cada lote foram realizados os testes de viabilidade e pureza, a fim de garantir as características qualitativas e quantitativas. Todos os testes foram satisfatórios com resultados compatíveis com as características da levedura quanto a pureza e dentro do estabelecido para o quantitativo das UFC (< 100 UFC/100 µL).

4.3 Teste de homogeneidade

Os resultados dos testes de homogeneidade estão apresentados na **tabela 3**.

Tabela 3. Resultados das contagens obtidas nos testes de homogeneidade dos três lotes de *S. kudriavzevii* produzidos

Crioprotetor	Frasco	Contagem (UFC/100µL)				
		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5
Skim Milk 20% + trealose 10%	65	47	41	41	49	49
	50	23	40	38	49	45
	157	58	49	42	46	55
	76	31	42	39	37	47
	36	40	41	53	34	53
	30	45	50	40	40	44
	124	41	52	36	36	42
	64	44	52	45	51	46
	181	33	41	31	31	38
	54	57	46	37	38	44
Skim Milk 20%	71	42	47	53	59	61
	87	40	35	35	34	37
	179	40	38	49	43	51
	66	50	37	40	47	39
	41	42	40	47	50	34
	57	39	44	54	36	39
	133	39	58	51	51	31
	16	42	41	58	45	46
	62	46	44	48	43	43
	181	41	28	44	30	38
Skim Milk 20% + maltose 10%	26	40	42	41	41	40
	177	40	41	42	43	40
	127	40	41	41	43	40
	188	40	40	39	38	41
	199	42	41	44	41	43
	123	38	42	41	39	42
	95	39	41	41	39	40
	121	40	42	42	43	41
	176	38	40	39	41	39
	50	42	41	40	42	40

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Na tabela 4 estão descritos os parâmetros estatísticos obtidos após análise dos dados pela Anova.

Tabela 4. Parâmetros da Anova para a avaliação da homogeneidade dos três lotes de *S. kudriavzevii* produzidos

Avaliação da homogeneidade			
ANOVA	Crioprotetor		
	<i>Skim Milk</i> 20% + Trealose 10%	<i>Skim Milk</i> 20%	<i>Skim Milk</i> 20% + Maltose 10%
MQ _{entre}	73,27	72,97	2,47
MQ _{dentro}	51,06444444	51,06444444	1,871111111
F _{calculado}	1,434853562	1,320909932	1,320071259
F _{crítico}	2,578739184	2,578739184	2,578739184

Legenda: MQ_{entre}- Média Quadrática entre os frascos; MQ_{dentro}- Média Quadrática dentro dos frascos e F- razão entre as variâncias entre e dentro dos frascos.
Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Todos os lotes produzidos se apresentaram suficientemente homogêneos já que o F_{calculado} foi menor quando comparado ao F_{crítico} (**Tabela 4**).

Os valores da incerteza de cada lote foram descritos na **tabela 5**.

Tabela 5. Incerteza referente a homogeneidade de cada lote de *S. kudriavzevii* produzido

Crioprotetor	Incerteza (UFC/100 µL)
<i>Skim Milk</i> 20% + trealose 10%	1,490152863
<i>Skim Milk</i> 20%	1,480052552
<i>Skim Milk</i> 20% + maltose 10%	0,244722065

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

4.4 Teste de estabilidade em longo prazo

Os resultados dos testes de estabilidade em longo prazo referente aos lotes 091940001 (*Skim Milk* 20% + trealose 10%), 101940001 (*Skim Milk* 20%) e 121940001 (*Skim Milk* 20% + maltose 10%) estão descritos nas **tabelas 6, 7 e 8**, respectivamente.

Tabela 6. Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em longo prazo do lote 091940001 (*Skim Milk* 20% + trealose 10%) de *S. kudriavzevii*

Teste de estabilidade em longo prazo						
Crioprotetor: <i>Skim Milk</i> 20% + trealose 10%						
Mês	Frasco	Contagem (UFC/100µL)				
		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5
0	87	44	46	44	45	43
	198	34	37	36	39	39
	128	46	47	41	41	47
1	118	37	39	37	42	40
	68	36	36	47	34	48
	149	33	33	36	39	36
	57	44	41	52	44	50
	154	50	50	51	50	49
	34	41	43	44	40	42
	193	49	43	49	49	46
	9	45	45	42	49	47
	63	51	50	47	48	46
	185	40	46	40	48	43
	137	41	41	42	41	40
	24	41	44	40	46	40
2	153	42	40	43	41	43
	195	41	41	40	39	42
	113	41	41	43	47	40
	42	31	30	25	27	32
	199	42	40	40	42	41
	56	47	48	49	48	50
3	4	42	53	49	52	52
	49	41	42	40	43	45
	17	49	49	51	50	50
	37	40	40	41	42	43
	144	43	44	42	47	41
	136	42	47	48	48	45
4	8	45	47	42	47	43
	101	40	37	40	42	41
	85	40	43	38	38	40
5	28	35	44	39	38	39
	141	39	41	40	39	40
	179	40	41	36	36	40
6	14	40	42	47	47	50
	97	49	43	44	47	48
	120	47	47	49	42	47
7	190	33	36	36	36	35
	27	43	47	43	40	40
	109	42	43	45	47	48
8	168	41	48	47	43	48
	108	43	47	47	40	45
	126	41	45	49	44	49
9	82	34	33	35	31	33
	73	40	38	35	38	39
	163	41	40	40	39	40
10	184	41	45	44	37	47
	167	38	33	39	33	36
	78	32	33	39	32	31
11	39	42	38	38	35	37
	162	41	40	38	41	41
	107	37	35	38	40	40
12	172	41	42	47	45	45
	177	42	41	47	47	43
	84	40	45	43	41	43

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.
Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 7. Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em longo prazo do lote 101940001 (*Skim Milk 20%*) de *S. kudriavzevii*

Teste de estabilidade em longo prazo						
Crioprotetor: <i>Skim Milk 20%</i>						
Mês	Frasco	Contagem (UFC/100µL)				
		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5
0	73	33	42	45	56	52
	114	33	47	36	56	53
	107	37	40	45	47	40
1	146	36	45	35	35	33
	173	39	34	35	31	39
	11	32	35	45	48	45
	132	31	30	35	30	37
	23	44	52	40	53	44
	82	46	40	42	40	48
	103	32	34	33	33	34
	21	42	46	48	50	51
	197	25	29	34	27	29
	127	35	37	30	32	38
	78	38	46	36	47	45
	77	35	42	37	42	40
2	105	39	37	43	39	43
	98	39	41	39	38	37
	154	39	35	34	38	34
	32	49	47	48	48	46
	18	43	46	41	40	41
3	54	40	47	48	41	44
	195	39	43	45	47	43
	117	38	43	37	45	42
	172	43	40	40	40	41
	193	32	37	37	35	35
4	51	35	44	42	40	35
	148	38	38	35	37	38
	72	40	47	48	42	46
5	161	41	49	47	49	47
	177	41	39	44	44	43
6	28	42	39	41	42	45
	131	20	20	12	14	15
	100	37	33	38	36	33
7	165	32	39	36	37	36
	190	37	38	40	37	45
	50	36	22	42	33	47
8	143	34	35	38	37	39
	70	43	47	46	42	41
	163	32	32	31	35	30
9	198	31	30	31	30	33
	75	30	30	36	25	14
	134	14	15	16	25	36
10	39	31	36	33	32	30
	142	13	13	14	17	20
	106	30	25	28	27	28
11	31	41	45	44	40	47
	22	41	37	40	41	40
	124	35	35	32	34	33
12	33	31	35	31	30	30
	126	26	27	28	27	23
	111	32	31	33	30	30
12	68	43	38	41	38	40
	15	41	39	45	40	42
	113	40	38	37	37	38

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.
Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 8. Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em longo prazo do lote 121940001 (*Skim Milk* 20% + maltose 10%) de *S. kudriavzevii*

Teste de estabilidade em longo prazo						
Crioprotetor: <i>Skim Milk</i> 20% + maltose 10%						
Mês	Frasco	Contagem (UFC/100µL)				
		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5
0	170	48	44	49	47	47
	34	48	48	47	48	46
	168	45	41	42	49	46
1	59	38	33	40	40	34
	7	33	33	37	35	34
	64	31	39	30	42	32
	68	32	30	39	32	42
	25	31	30	38	37	35
	79	39	42	38	41	44
	111	35	32	33	37	40
	146	40	49	44	42	49
	171	43	49	41	49	48
	67	38	37	38	40	41
	141	40	41	37	41	38
2	158	35	32	39	34	41
	179	41	37	39	42	41
	80	40	45	40	41	43
	125	30	39	52	53	49
	31	37	38	44	34	37
	87	30	34	36	38	38
3	58	33	40	39	34	34
	200	37	43	35	47	45
	105	47	49	48	52	45
	66	44	45	43	51	47
	73	36	37	39	39	34
	81	35	39	37	38	32
4	37	32	30	33	39	39
	162	37	39	41	42	45
	152	27	31	30	26	28
5	153	47	41	38	37	47
	130	37	38	35	39	41
	20	36	38	44	38	36
6	18	34	40	38	40	38
	30	31	33	34	37	37
	193	43	41	48	40	49
7	94	37	36	35	35	41
	144	24	26	34	24	30
	186	34	47	34	38	40
8	44	41	40	32	33	35
	6	37	41	37	36	38
	161	38	40	41	39	43
9	154	45	44	42	45	43
	39	31	30	33	37	34
	86	39	37	36	33	37
10	118	36	31	35	34	37
	124	47	45	49	45	47
	110	45	42	42	44	43
11	195	47	48	48	44	40
	155	33	36	34	36	37
	101	32	contam.	contam.	contam.	contam.
12	22	32	35	36	34	30
	46	47	49	47	46	47
	27	45	42	42	43	42
	185	47	49	45	43	45

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL: microlitro, contam- contaminação.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Para a análise estatística do teste de estabilidade em longo prazo foi utilizada a ferramenta de regressão linear pelo programa Microsoft Excel, conforme estabelece a ABNT ISO GUIA 35. Para que fosse possível realizar essa análise, foi necessário anteriormente realizar o cálculo da mediana para cada dia em cada lote. Os resultados das medianas estão descritos na **tabela 9**.

Os resultados obtidos pelo teste de regressão linear foram descritos na **tabela 10**.

Tabela 9. Mediana dos valores obtidos em cada mês para cada lote de *S. kudriavzevii* produzido

Valores da mediana (UFC/100µL)			
Crioprotetores			
Mês	<i>Skim milk</i> 20% + Trealose 10%	<i>Skim milk</i> 20%	<i>Skim milk</i> 20% + Maltose 10%
1	43	37	38
2	41	41	39
3	45	39,5	39
4	41	44	38
5	39	36	38
6	47	37	37
7	42	37	34
8	45	30	41
9	38	28	35
10	37	40	45
11	38	30	33
12	43	40	45

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.
Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 10. Resultados da regressão linear para análise da estabilidade em longo prazo dos três lotes de *S. kudriavzevii* produzidos.

Parâmetros estatísticos do teste de estabilidade em longo prazo			
Regressão Linear	Crioprotetores		
	<i>Skim milk</i> 20% +Trealose 10%	<i>Skim Milk</i> 20%	<i>Skim milk</i> 20% +Maltose 10%
R ²	0,113879359	0,168317317	0,034920494
F de significação	0,283390646	0,185285983	0,560874268
Coefficiente	-0,383170548	-0,299929923	0,178343949
Erro padrão	0,337999487	0,210830882	0,296482961
Valor p	0,283390646	0,185285983	0,560874268

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Para a análise da estabilidade em longo prazo os parâmetros de R², F de significação e valores de P foram avaliados. O valor de R² deve ser o mais próximo de 0, para que não haja relação das UFC com o tempo.

O lote com crioprotetor *Skim Milk* 20% + maltose 10% obteve o melhor resultado, pois o valor de R² foi o mais próximo de zero, embora os demais também tenham apresentado valores baixos. Todos os valores de F significação e o valor de P foram maiores que o nível de significância do teste (0,05), sendo o lote com o crioprotetor *Skim Milk* 20% + maltose 10% o que apresentou o maior valor também.

Os valores de F de significação e o valor de P devem ser maiores que o nível de significância do teste (0,05), para que a estabilidade seja considerada satisfatória.

Para o cálculo da incerteza do teste de estabilidade em longo prazo, o valor do erro padrão foi multiplicado pelo tempo da análise, que foram 12 meses.

Os valores de incertezas calculados foram 4,055993839 para o lote *Skim Milk* 20% + trealose 10%, 2,529970584 para o lote *Skim Milk* 20% e 3,557795531 para o lote *Skim Milk* 20% + maltose 10%.

4.5 Teste de estabilidade em curto prazo

Para os testes de estabilidade em curto prazo foram escolhidos aleatoriamente três frascos, por dia, durante 7 dias, no total de 21 frascos por lote, todos esses frascos foram analisados no 8° dia de incubação.

Esses testes foram realizados utilizando as temperaturas de 4 °C e 35 °C para a incubação dos frascos, de cada lote. Os dados obtidos estão descritos nas **tabelas 11, 12 e 13**.

Tabela 11. Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em curto prazo do lote 091940001 produzido em *Skim Milk* 20% e trealose 10%

Teste de estabilidade em curto prazo												
Lote 091940001 (Skim Milk 20% + Trealose 10%)												
Temperatura: 4°C							Temperatura: 35°C					
Dia	Frasco	Contagem (UFC/100µL)					Frasco	Contagem (UFC/100µL)				
		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5
1	40	36	32	44	39	41	122	1	12	6	4	4
	25	37	41	36	35	40	71	0	3	8	2	1
	2	42	37	36	35	38	145	31	38	42	45	43
2	16	35	37	35	38	35	166	51	50	40	42	51
	171	37	38	45	40	41	67	3	7	5	5	5
	22	45	41	44	46	39	140	5	4	5	7	10
3	151	37	40	35	35	38	183	35	46	31	47	30
	70	41	34	40	39	35	129	11	4	11	10	7
	135	36	38	41	35	37	187	1	1	5	9	6
4	59	42	40	46	38	45	139	5	4	9	4	5
	46	34	38	35	39	34	173	10	10	6	11	11
	77	39	36	37	31	32	123	43	47	45	42	45
5	180	37	40	39	37	37	72	9	11	9	10	10
	38	37	39	34	36	35	130	41	41	45	46	41
	106	37	39	43	38	42	55	10	12	10	9	12
6	133	36	36	40	41	35	110	22	23	20	19	23
	86	35	37	40	42	35	104	18	15	18	15	12
	75	32	34	31	31	33	52	26	32	30	27	31
7	114	41	44	45	48	47	169	24	26	26	28	30
	12	35	40	37	40	37	160	47	43	45	39	40
	102	39	35	37	42	35	5	34	31	36	36	37

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.
 Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 12. Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em curto prazo do lote 101940001 produzido em *Skim Milk* 20%

Teste de estabilidade em curto prazo												
Lote 101940001 (Skim Milk 20%)												
Temperatura: 4°C							Temperatura: 35°C					
Dia	Frasco	Contagem (UFC/100µL)					Frasco	Contagem (UFC/100µL)				
		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5
1	6	43	42	40	42	43	118	20	23	25	32	21
	88	38	40	38	41	40	42	26	24	25	26	23
	60	34	36	35	36	35	55	34	34	33	30	30
2	17	41	36	36	37	38	64	29	24	28	29	24
	1	0	0	0	0	0	13	24	27	17	15	22
	34	41	38	38	37	40	199	24	25	23	20	24
3	196	31	31	31	32	30	52	20	21	20	26	27
	92	30	31	30	35	35	108	25	30	25	24	29
	189	29	29	30	30	31	24	26	24	23	22	28
4	93	38	37	37	38	41	56	41	42	43	42	45
	63	34	37	39	37	49	149	23	21	27	25	28
	47	30	31	27	30	37	121	26	28	27	29	27
5	61	43	42	40	43	43	129	29	27	26	29	29
	194	33	32	32	37	38	184	27	30	30	29	28
	84	30	31	32	30	31	89	30	31	31	35	35
6	26	33	35	25	25	30	85	34	34	33	32	37
	144	30	30	33	28	30	65	36	33	31	34	36
	125	26	31	29	34	40	29	40	40	43	41	40
7	19	30	32	32	35	36	43	36	44	37	41	39
	101	30	30	30	32	31	48	36	35	36	36	37
	119	30	31	33	31	32	110	31	32	35	32	35

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 13. Resultados das contagens obtidas nos testes de estabilidade em curto prazo do lote 121940001 produzido em *Skim Milk* 20% e maltose 10%

Teste de estabilidade em curto prazo												
Lote 121940001 (Skim Milk 20% + Maltose 10%)												
Temperatura: 4°C							Temperatura: 35°C					
Dia	Frasco	Contagem (UFC/100µL)					Frasco	Contagem (UFC/100µL)				
		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5		Alíquota 1	Alíquota 2	Alíquota 3	Alíquota 4	Alíquota 5
1	97	43	41	45	40	42	16	21	22	31	30	28
	145	42	45	46	44	49	107	32	40	40	35	35
	82	40	44	42	43	41	19	24	21	21	22	24
2	2	43	45	40	41	40	138	32	30	32	31	32
	184	47	45	44	40	41	150	33	30	32	31	30
	134	45	48	43	45	47	9	34	35	30	31	30
3	135	47	49	52	50	49	17	35	30	30	30	29
	175	47	49	45	44	42	194	30	28	25	29	30
	157	40	42	41	47	42	54	32	35	32	34	35
4	187	44	47	44	50	49	172	31	32	30	32	31
	75	42	47	47	43	47	190	29	29	31	29	30
	93	43	48	42	47	44	10	33	31	30	29	28
5	137	50	47	47	48	51	122	42	42	43	41	40
	84	50	47	46	46	45	65	37	40	40	39	40
	11	37	34	36	35	32	45	34	37	38	38	39
6	147	48	49	49	45	47	69	35	32	33	32	30
	142	48	48	50	47	48	197	30	34	33	30	32
	98	47	44	45	49	46	131	38	38	34	38	39
7	112	41	42	42	42	42	55	42	46	44	42	44
	119	50	51	51	50	49	163	38	39	39	38	40
	192	44	42	43	41	40	191	39	37	38	41	40

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Como no teste de estabilidade em longo prazo, foi realizado o cálculo da mediana para cada dia e temperatura para cada lote no teste de estabilidade em curto prazo, os resultados obtidos estão descritos na **tabela 14**.

Tabela 14. Mediana dos valores obtidos em cada dia e temperatura de cada lote produzido de *S. kudriavzevii* em diferentes crioprotetores

Valores da mediana (UFC/100µL)						
Dia	Skim Milk 20% + Trealose 10%		Skim Milk 20%		Skim Milk 20% + Maltose 10%	
	Temperatura					
	4°C	35°C	4°C	35°C	4°C	35°C
1	37	6	40	26	43	28
2	39	7	37	24	44	31
3	37	10	31	25	47	30
4	38	10	37	28	47	30
5	37	11	33	29	46	40
6	35	22	30	36	48	33
7	40	36	31	36	42	40

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Os resultados da análise de regressão linear, estão descritos na **tabela 15**.

Tabela 15. Resultados da regressão linear para análise da estabilidade em curto prazo dos três lotes de *S. kudriavzevii* produzidos

Parâmetros estatísticos do teste de estabilidade em curto prazo						
Regressão linear	Temperatura 4°C			Temperatura: 35°C		
	Skim Milk 20% + Trealose 10%	Skim Milk 20%	Skim Milk 20% + Maltose 10%	Skim Milk 20% + Trealose 10%	Skim Milk 20%	Skim Milk 20% + Maltose 10%
R ²	0,002272727	0,611334405	0,018181818	0,747294814	0,807101727	0,616370809
F de significação	0,919159519	0,037797966	0,773163878	0,012059241	0,005980702	0,036488654
Coeficiente	0,063636364	-0,438906752	0,127272727	0,172927726	0,389635317	0,345167653
Erro padrão	0,596283254	0,156507765	0,418260862	0,044971847	0,085187004	0,121781096
valor- P	0,919159519	0,037797966	0,773163878	0,012059241	0,005980702	0,036488654

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Para a análise da estabilidade em curto prazo os parâmetros de R², F de significação e valores de P foram avaliados.

O valor de R², como no teste de estabilidade em longo prazo, deve ser o mais próximo de 0, para que não haja relação das UFC com o tempo, com isso,

a temperatura de 4 °C se apresentou mais estável quando comparada com 35 °C, dentre os crioprotetores avaliados, sendo o melhor resultado obtido para o *Skim Milk* 20% + trealose 2%.

O F de significação e o valor de P, no *Skim Milk* 20% + trealose 10% e *Skim Milk* 20% + maltose 10%, na temperatura de 4 °C, tiveram o valor esperado, pois foram maiores que o nível de significância do teste (0,05), já o *Skim Milk* 20% não obteve esse valor esperado, com isso, o lote contendo este crioprotetor não foi considerado suficientemente estável na temperatura de 4 °C. Para a temperatura de 35 °C, nenhum dos crioprotetores alcançou o resultado esperado, logo, todos os lotes foram considerados não suficientemente estáveis nessa temperatura e tempo.

Para o cálculo da incerteza do teste de estabilidade em curto prazo na temperatura de 4 °C, o valor do erro padrão foi multiplicado pelo número de dias da análise, que foram 7 dias.

A incerteza do lote com o crioprotetor *Skim Milk* 20% + trealose 10% foi de 4,173983 e a do *Skim Milk* 20% + maltose 10% foi de 2,927826.

Como o teste de estabilidade em curto prazo foi insatisfatório para o lote *Skim Milk* 20% no prazo determinado de 7 dias, na temperatura 4°C, foram feitos os testes estatísticos a fim de se avaliar qual seria o comportamento em um tempo menor de 5 dias. Os resultados dessa análise de regressão linear, estão descritos na **tabela 16**.

Tabela 16. Resultados da regressão linear para análise da estabilidade em curto prazo (5 dias) do lote *Skim Milk* 20%

Parâmetros estatísticos do teste de estabilidade em curto prazo (5 DIAS)	
Temperatura 4°C	
Regressão linear	<i>Skim Milk</i> 20%
R ²	0,3828125
F de significação	0,265860589
Coefficiente	-1,4
Erro padrão	3,245509719
valor- P	0,265860589

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

De acordo com os dados encontrados, o valor de R² foi próximo de 0, o F de significação e o valor de P, tiveram o valor esperado, pois foram maiores que

o nível de significância do teste (0,05). Com isso, o lote de *Skim Milk* 20% possui estabilidade para 5 dias, na temperatura de 4°C. Para o cálculo da incerteza o valor do erro padrão foi multiplicado pelo número de dias que, nessa análise foram 5 dias, logo a incerteza foi de 16,22754859.

4.6 Avaliação do valor de propriedade utilizando o teste não paramétrico de Kruskal Wallis

O teste não paramétrico de Kruskal Wallis foi realizado para a comparação dos resultados de três analistas diferentes que realizaram a metodologia da abertura dos frascos escolhidos aleatoriamente. Todos os p - valores foram >0,05, demonstrando que o analista não interferiu nos resultados (**Tabela 17**). O lote com o crioprotetor *Skim Milk* 20% foi o que apresentou o p - valor mais próximo de 0,05.

Tabela 17. Resultados obtidos no teste não paramétrico Kruskal Wallis, valor de propriedade quantitativo e incerteza dos três lotes de *S. kudriavzevii*

Avaliação do valor de propriedade					
Crioprotetores	p - valor	Comparação entre os analistas	p - valor	Valor de propriedade quantitativo (UFC/ 100µL)	Incerteza
<i>Skim Milk</i> 20% + Trealose 10%	0,895	A-B	0,999	41	1,16
		A-C	0,849		
		B-C	0,97		
<i>Skim Milk</i> 20%	0,067	A-B	0,051	40	5
		A-C	0,487		
		B-C	0,487		
<i>Skim Milk</i> 20% + Maltose 10%	0,767	A-B	0,991	36	1,73
		A-C	0,925		
		B-C	0,694		

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia, µL- microlitro.
Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

4.7 Caracterização taxonômica

4.7.1 Caracterização fenotípica

Para a caracterização fenotípica foram avaliados os aspectos macroscópicos e microscópicos e a avaliação fisiológica pelo sistema automatizado VITEK® 2.

Os resultados da caracterização fenotípica estão apresentados na **tabela 18**.

O aspecto da pureza foi analisado antes de qualquer caracterização. No aspecto macroscópico foram observadas as características cor, superfície, brilho, textura e margem no meio de cultura YMA das colônias, na temperatura de 25 °C, já no YMB, meio de cultura líquido, foram analisadas a formação de anel, película e sedimento, em duas temperaturas, 25 °C e 36 °C (**Tabela 18**).

No aspecto microscópico foram observadas a formação do brotamento, forma celular, agrupamento e as dimensões das células (média de dez colônias), além dessas características, foram pesquisadas a formação de ascósporos no meio de cultura ágar acetato e a formação de hifas verdadeiras e pseudohifas pela técnica de Dalmau (**Tabela 18**).

Todas as cepas do gênero *Saccharomyces* spp. estudadas tiveram resultados satisfatórios.

O resultado da avaliação pelo sistema semi-automatizado VITEK® 2 está apresentado na **tabela 19**. Todas as cepas tiveram resultados de identificação como *S. cerevisiae* com probabilidade variando de 94 a 99%.

Tabela 18. Aspectos macroscópicos, microscópicos, técnica de Dalmau e crescimento em meio de cultura líquido observados para as leveduras de *Saccharomyces* spp. (n= 9) avaliadas neste estudo (continua)

Características macroscópicas e microscópicas das leveduras do gênero <i>SACCHAROMYCES</i> SPP.							
Características fenotípicas		<i>S. kudriavzevii</i> CFRVS 40001	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40002	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40003	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40083	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40125	
Aspectos macroscópicos	Cor	creme	creme	creme	creme	creme	
	Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	
	Brilho	opaca	opaca	pouco	opaca	pouco	
	Textura	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	
	Margem	regular	regular	regular	regular	regular	
Aspectos microscópicos	Brotamento	presente	presente	presente	presente	presente	
	Forma celular	globosa	globosa e ovoide	globosa e ovoide	ovoide e alongada	globosa e ovoide	
	Agrupamento	maioria em grupo	maioria em grupo	maioria individual	maioria em grupo	maioria em grupo	
	Dimensões (média em µm)	7,41x 5,74	6,73x4,19	5,38x3,70	6,64x3,91	5,3x4,1	
Dalmau	Ascósporos	presente	presente	presente	presente	presente	
	Hifa verdadeira	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
Aspectos em meio de cultura líquido	25°C	Pseudohifa	ausente	presente	rudimentar	presente	ausente
		Anel	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		Película	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
	36°C	Sedimento	presente	presente	presente	presente	presente
		Anel	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		Película	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Sedimento	presente	presente	presente	presente	presente		

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 18. Aspectos macroscópicos, microscópicos, técnica de Dalmau e crescimento em meio de cultura líquido observados para as leveduras de *Saccharomyces* spp. (n=9) avaliadas neste estudo (conclusão)

Características macroscópicas e microscópicas das leveduras do gênero SACCHAROMYCES SPP.					
Características fenotípicas		<i>S. uvarum</i> CFRVS 40088	<i>S. pastorianus</i> CFRVS 40090	<i>S. bayanus</i> ou <i>pastorianus</i> CFRVS 40235	<i>S. pastorianus</i> CFRVS 40302
Aspectos macroscópicos	Cor	creme	creme	creme	creme
	Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa
	Brilho	opaca	opaca	opaca	opaca
	Textura	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa
	Margem	regular	regular	regular	regular
Aspectos microscópicos	Brotamento	presente	presente	presente	presente
	Forma celular	globosa e ovoide	globosa e ovoide	globosa e ovoide	globosa e ovoide
	Agrupamento	grupo e individual	maioria em grupo	maioria em grupo	maioria em grupo
	Dimensões (média em µm)	5,50x4,01	5,01x3,63	4,4x3,6	4,74x3,02
Dalmau	Ascósporos	presente	presente	presente	presente
	Hifa verdadeira	ausente	ausente	ausente	ausente
Aspectos em meio de cultura líquido	25°C	Pseudohifa	rudimentar	ausente	ausente
		Anel	ausente	ausente	ausente
		Película	ausente	ausente	ausente
	36°C	Sedimento	presente	presente	presente
		Anel	ausente	ausente	ausente
		Película	ausente	ausente	ausente
		Sedimento	presente	presente	presente

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 19. Avaliação fisiológica pelo sistema automatizado VITEK® 2 das leveduras *Saccharomyces* spp. (n= 9)

Avaliação fisiológica pelo Vitek 2			
Levedura	N° de acesso CFRVS	Resultado Vitek 2	Probabilidade
<i>S. kudriavzevii</i>	CFRVS 40001	<i>S. cerevisiae</i>	99%
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40002	<i>S. cerevisiae</i>	97%
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40003	<i>S. cerevisiae</i>	97%
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40083	<i>S. cerevisiae</i>	94%
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40125	<i>S. cerevisiae</i>	98%
<i>S. uvarum</i>	CFRVS 40088	<i>S. cerevisiae</i>	98%
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40090	<i>S. cerevisiae</i>	99%
<i>S. bayanus</i> ou <i>pastorianus</i>	CFRVS 40235	<i>S. cerevisiae</i>	98%
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40302	<i>S. cerevisiae</i>	97%

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

4.7.1.1 Avaliação por MALDI-TOF MS

No teste sem o procedimento da extração, antes da aplicação das cepas na placa, os resultados não foram satisfatórios, apenas as leveduras *S. cerevisiae* CFRVS 40083 e a CFRVS 40125 foram identificadas, sendo assim, todas as cepas passaram pela extração antes da aplicação na placa (**Tabelas 20 e 21**).

Tabela 20. Resultados da avaliação das cepas de *Saccharomyces* spp. (n= 9) utilizadas no estudo por MALDI-TOF MS sem a etapa de extração

Avaliação por MALDI-TOF MS				
Levedura	Nº de acesso CFRVS	Resultado	Valor do Score Analista A	Valor do Score Analista B
<i>S. kudriavzevii</i>	CFRVS 40001	não identificado	1,56	1,49
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40002	não identificado	1,67	1,67
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40003	não identificado	1,42	1,41
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40083	<i>S. cerevisiae</i>	1,96	1,90
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40125	<i>S. cerevisiae</i>	1,81	1,74
<i>S. uvarum</i>	CFRVS 40088	não identificado	1,43	1,31
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40090	não identificado	1,46	1,44
<i>S. bayanus</i> ou <i>pastorianus</i>	CFRVS 40235	não identificado	1,60	1,40
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40302	não identificado	1,63	1,60

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Todas as cepas da levedura do gênero *Saccharomyces* foram identificadas como *S. cerevisiae*, apenas as leveduras CFRVS 40235 com ambos os analistas e a CFRVS 40001 analisada pelo analista B apresentaram o *score* < 2,00; as demais apresentaram *score* acima de 2,00; tanto para o analista A quanto para o B, representando uma alta identificação, de acordo com a interpretação dos valores de *score* fornecidos pelo equipamento.

Tabela 21. Resultado da avaliação das cepas de *Saccharomyces* spp. (n= 9) utilizadas no estudo por MALDI-TOF MS com a etapa de extração

Avaliação por MALDI-TOF MS				
Levedura	Nº de acesso CFRVS	Resultado	Valor do Score Analista A	Valor do Score Analista B
<i>S. kudriavzevii</i>	CFRVS 40001	<i>S. cerevisiae</i>	2,06	1,71
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40002	<i>S. cerevisiae</i>	2,15	2,14
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40003	<i>S. cerevisiae</i>	2,11	2,08
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40083	<i>S. cerevisiae</i>	2,21	2,20
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40125	<i>S. cerevisiae</i>	2,19	2,09
<i>S. uvarum</i>	CFRVS 40088	<i>S. cerevisiae</i>	2,20	2,14
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40090	<i>S. cerevisiae</i>	2,03	2,02
<i>S. bayanus</i> ou <i>pastorianus</i>	CFRVS 40235	<i>S. cerevisiae</i>	1,99	1,76
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40302	<i>S. cerevisiae</i>	2,24	2,22

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

A biblioteca do equipamento contemplava apenas as leveduras *S. cerevisiae*, *S. paradoxos* e *S. servazzi*, e com o objetivo de acrescentar novas espécies do gênero, todas as cepas foram adicionadas ao programa. Cada levedura foi colocada em oito poços da placa e para cada poço foram feitas três leituras, com isso, 24 espectros, de cada levedura, foram formados. Para que a levedura pudesse ser adicionada na biblioteca, no mínimo tinham que ser gerados 20 espectros de cada. Após a análise dos 24 espectros gerados, em uma análise visual alguns picos que estavam muito distintos entre si foram removidos e os espectros de cada levedura foram adicionados a biblioteca. As leveduras *S. kudriavzevii*, *S. uvarum*, *S. pastorianus* e a *S. bayanus* ou *S. pastorianus* que antes não existiam na biblioteca passaram a fazer parte dela.

4.7.2 Caracterização genotípica

As curvas de *melting* obtidas após a análise por HRM estão apresentadas na **Figura 1**. As primeiras curvas correspondem ao par de iniciadores Sch1 + Sch4 e o segundo grupo de curvas ao par Sch3 + Sch4. Na **tabela 22** estão descritas as temperaturas de *melting* de cada levedura.

Figura 1. Curvas de *melting* formadas para os dois pares de iniciadores

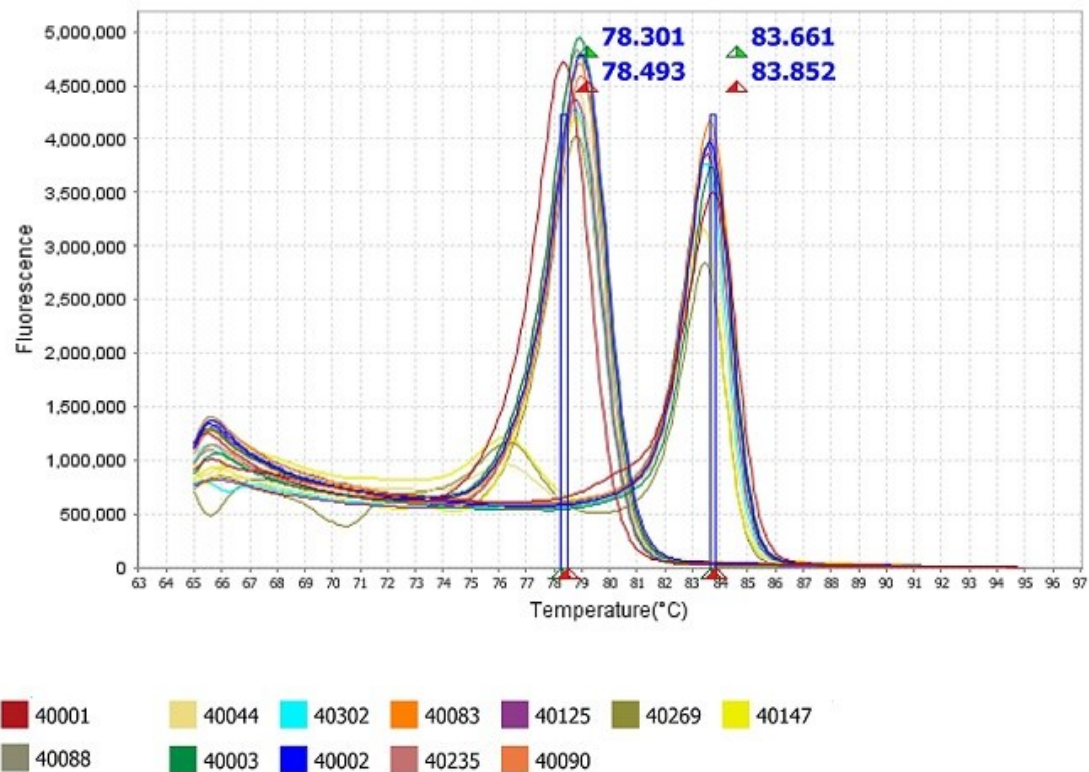


Tabela 22. Temperaturas de *melting*, pela avaliação da técnica HRM, dos iniciadores ScH1 + ScH4 e ScH3 + ScH4 das cepas estudadas (n= 11)

Avaliação pelo método de HRM			
Levedura	Nº de acesso CFRVS	Temperatura de melting (°C) ScH1 + ScH4	Temperatura de melting (°C) ScH3 + ScH4
<i>S. kudriavzevii</i>	CFRVS 40001	78,378	83,733
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40002	78,986	83,679
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40003	78,660	83,706
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40083	78,986	83,679
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40125	78,759	83,570
<i>S. uvarum</i>	CFRVS 40088	78,886	83,624
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40090	78,913	83,651
<i>S. bayanus</i> ou <i>pastorianus</i>	CFRVS 40235	78,415	83,742
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40302	78,814	83,415
<i>C. krusei</i>	CFRVS 40147	78,769	83,325
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40044	78,841	83,570

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

A temperatura de *melting* para a levedura *S. kudriavzevii* foi distinta das outras espécies na primeira casa decimal para o par de iniciadores ScH1 + ScH4. Já para o segundo par de iniciadores estudado, houve diferença na segunda casa decimal, com isso, o primeiro iniciador foi o que obteve melhor resultado, já que o objetivo era a identificação inequívoca do MRC.

Na **figura 1**, pode-se observar que o pico correspondente a levedura *S. kudriavzevii* (cor vermelha), no par de iniciadores ScH1 + ScH4, está bem separado dos demais.

4.8 Certificado de análise do MRC

O certificado de análise do MRC foi elaborado segundo as normas da ABNT NBR ISO 17034:2017 e as orientações da ABNT ISO GUIA 31 e está apresentado no **APÊNDICE D**, sendo o *Skim Milk* 20% + Maltose 2% o crioprotetor selecionado.

O valor que propriedade quantitativo e sua incerteza foi de $36 \pm 4,93$ UFC/100 μ L.

A incerteza expandida do material foi calculada substituindo os valores das incertezas encontrados para todos os testes (homogeneidade, estabilidade em curto e longo prazo e a caracterização) na expressão matemática, de acordo com o descrito no item 3.4, segue abaixo a exemplificação:

$$U_{MRC} = \sqrt{u_{\text{homog}}^2 + u_{\text{ELP}}^2 + u_{\text{ECP}}^2 + u_{\text{car}}^2}$$

$$U_{MRC} = \sqrt{(0,244722065)^2 + (3,557795531)^2 + (2,927826)^2 + (1,73)^2}$$

$$U_{MRC} = 4,93$$

5 DISCUSSÃO

A produção de um MRC microbiológico é um grande desafio, pois requer um olhar amplo que passa por campos diferentes do conhecimento como a estatística e a microbiologia. Atualmente no Inmetro, a Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro (Cgcre) possui dez produtores de MR acreditados pela ABNT NBR ISO 17034:2017, dentre eles, apenas um laboratório possui acreditação em MRC microbiológico, mas seu escopo inclui apenas cepas de bactérias (dados atualizados em novembro de 2021, INMETRO, 2021). Esse cenário de acreditação, destaca que a produção de MRC envolvendo a área de química está mais abrangente quando comparado ao MRC microbiológico. Janning et al. (1995) já descreviam a necessidade dos MRC para as análises microbiológicas, como também afirmavam a limitação da produção devido as instabilidades dos micro-organismos. O presente estudo demonstrou que é possível a produção de um MRC microbiológico, embora existam todos os desafios que foram enfrentados nas etapas do processo. A produção do MRC seguiu a norma ABNT NBR ISO 17034:2017, além dos guias ABNT ISO GUIA 31 e ABNT ISO GUIA 35 (ABNT, 2020, 2017a, 2017c).

Para a produção do MRC foram utilizados os métodos de liofilização e criopreservação, que garantem a manutenção das leveduras por longo prazo. Esta técnica também tem sido utilizada na produção de MR contendo bactérias em *Skim Milk* (ROSAS et al., 2010; BRANDÃO et al., 2013a, 2013b, 2014). Os crioprotetores *Skim Milk* 20% + trealose 10% e *Skim Milk* 20% + maltose 10%, testados nesse estudo, conseguiram desempenhar seu papel aumentando a estabilidade do material quando comparado ao estudo anterior de Souto (2018).

O crioprotetor que apresentou os melhores resultados foi o *Skim Milk* 20% + maltose 10%. A adição do dissacarídeo maltose ao *Skim Milk* 20% conseguiu solucionar o problema com a estabilidade em longo prazo, permitindo assim, o estabelecimento de 12 meses de validade para o MRC. O açúcar pode evitar a formação de cristais de gelo dentro da célula, podendo ainda reduzir o ponto de congelamento e minimizar a formação de gelo extracelular, o que pode explicar os melhores resultados encontrados no presente estudo (LIMA, 2011).

Blanquet et al. (2005) demonstraram que a taxa de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* após o processo de liofilização, utilizando os açúcares maltose e trealose como crioprotetores, aumentou estatisticamente quando comparada ao controle. Além disso, a combinação do *Skim Milk* com a trealose apresentou resultados melhores, quando comparado ao uso somente da trealose, o que pode ser observado no presente estudo. No estudo desenvolvido por Brandão et al. (2013a), os dissacarídeos trealose e sacarose foram considerados os melhores crioprotetores para a bactéria *Escherichia coli* estabelecida como MR.

O primeiro teste estatístico que foi realizado após a produção do lote piloto foi a homogeneidade, e os três lotes pilotos produzidos neste estudo se apresentaram suficientemente homogêneos (**Tabela 4**). Esses resultados foram concordantes com Souto (2018), que obteve a homogeneidade satisfatória para o lote de *S. kudriavzevii* com o *Skim Milk* 20% como crioprotetor.

O teste de estabilidade em longo prazo, com duração de 12 meses, prevê as condições do armazenamento, assim como, define o prazo de validade para o MRC. O teste de estabilidade em curto prazo, mimetiza as condições do transporte. A estabilidade ao longo do tempo é um grande desafio para o MRC microbiológico, visto a instabilidade do organismo, além das variáveis externas que podem interferir como a temperatura (JANNING, 1995). Os testes de estabilidade foram críticos, já que Souto (2018) obteve estabilidade de apenas 5 meses para o MRC de *S. kudriavzevii*, o que impulsionou o presente estudo. Esse estudo propôs o uso de novos agentes crioprotetores, a fim de se obter maior estabilidade e prazo de validade.

Os três lotes produzidos apresentaram resultados satisfatórios para a estabilidade em longo prazo, durante 12 meses, na temperatura de $(-20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. No estudo desenvolvido pelo *Institute for Reference Materials and Measurements*, na Bélgica, a levedura *C. albicans*, foi produzida em formato de esferas, chamadas *BioBalls*. A levedura se manteve estável a -20 e a -70 $^\circ\text{C}$ por até 18 meses (BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009). Resultados similares foram obtidos no presente estudo, que utilizou apenas a temperatura de -20 $^\circ\text{C}$, por 12 meses, uma vez que a maioria dos laboratórios que realizam controle de qualidade possuem freezers -20 $^\circ\text{C}$ (ROSAS et al., 2019).

No teste de estabilidade em curto prazo, a levedura *S. kudriavzevii* não obteve estabilidade suficiente na temperatura de 35 °C nos três lotes, corroborando o estudo de Souto (2018), assim como, Janning (1995), que ao realizar esse teste com a *E. coli*, ao final de 7 dias, teve perda total da viabilidade da bactéria, na temperatura de 37 °C. Em outro estudo do mesmo grupo de pesquisadores, a bactéria *Salmonella enteritidis* IRMM-352, na análise da estabilidade em curto prazo não apresentou resultado satisfatório na temperatura de 4 °C, sendo necessário o transporte a -20 °C, diferente do presente estudo (BAETS et al., 2008). Já Rosas et al. (2010) descreveram que o MR da bactéria do gênero *Salmonella* teve redução significativa do número de UFC nas temperaturas de 25 °C e 37 °C, durante 7 dias de exposição. Brandão et al. (2014) em seu estudo obteve resultados satisfatórios para a estabilidade em curto prazo em uma temperatura ≤ 35 °C em até quatro dias para a bactéria *Bacillus cereus* em leite em pó, como MR, o que difere do presente estudo.

Embora o lote *Skim Milk* 20% não tenha alcançado resultados satisfatórios no tempo de 7 dias no teste de estabilidade em curto prazo, como os demais, a redução para o período de 5 dias garantiu a estabilidade, na temperatura de 4°C, como descrito na **tabela 16**, com isso, o lote também seria um bom candidato ao MRC.

Após os testes de homogeneidade, estabilidade e suas análises estatísticas a próxima etapa para o estabelecimento de um MRC é a caracterização correta da levedura *S. kudriavzevii*, correspondendo ao valor de propriedade qualitativo do material. Nesse estudo foram realizadas a caracterização fenotípica e genotípica.

Na caracterização pelo método fenotípico, foram observadas as características macroscópicas e microscópicas das diferentes espécies da levedura *Saccharomyces* spp., visualizadas na **tabela 18**, todas elas foram compatíveis com a literatura utilizada como referência (KURTZMAN, 2011a).

Na análise fisiológica utilizando o sistema automatizado VITEK® 2, os resultados não foram satisfatórios para as espécies diferentes de *S. cerevisiae*. Esse fato se explica pela semelhança dos resultados da assimilação dos açúcares, entre essas leveduras, impossibilitando a diferenciação das espécies pelo equipamento (POSTERARO et al., 2015).

A técnica do MALDI-TOF MS também foi utilizada como opção para a caracterização fenotípica pela análise proteômica. O método está sendo utilizado amplamente para a identificação de fungos, bactérias e arqueias, pela maior facilidade quando comparado a uma análise molecular (LAY JR., 2001; CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012). Uma das limitações do método é a dependência das informações do banco de dados do equipamento utilizado (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011), e no presente estudo, o equipamento utilizado só contemplava os espectros da levedura *S. cerevisiae*, comum entre as estudadas, com isso, os resultados foram visivelmente impactados por essa limitação.

Os resultados por essa técnica foram semelhantes ao estudo desenvolvido por Souto (2018). No equipamento do fabricante Kratos/Shimadzu do modelo AXIMA, utilizado nesse estudo anterior, havia dois espectros referentes a levedura *S. pastorianus*, mesmo assim, foi encontrada a mesma limitação para a identificação.

Não houve diferença dos resultados quando as análises dos analistas A e B foram comparadas. Uma desvantagem do método foi solucionada pela inclusão de uma etapa de extração das amostras de leveduras antes da aplicação na placa do equipamento (**tabelas 20 e 21**), que acarretou um melhor percentual de identificação.

A levedura *S. kudriavzevii* quando comparada as outras espécies (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus*) é muito semelhante, apenas duas substituições de base na sequência ITS1 as diferem (NAUMOV et al., 2000). O estudo desenvolvido por Nadai et al. (2018), realizou a análise de HRM nas mesmas leveduras do presente estudo, além delas, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. arbicolus*, *S. eubayanus* e *S. uvarum*, com o desenvolvimento de dois iniciadores, tendo como resultados distintas curvas de *melting* para cada espécie. O presente trabalho, utilizando a metodologia supracitada, teve como resultado a curva gerada com os iniciadores ScH1 + ScH4 podendo ser visualizada separadamente das demais, com isso, a análise de HRM conseguiu diferenciar a levedura *S. kudriavzevii* das outras leveduras do mesmo gênero, além das leveduras *C. krusei* e *C. neoformans*, utilizadas como um controle. Este resultado foi similar ao reportado por Ninghui et al. (2015), que ao utilizarem a técnica de análise por HRM, obtiveram melhor

desempenho, tendo 100% de acerto, quando comparada com as metodologias do sistema automatizado VITEK® 2 e MALDI-TOF-MS para a identificação de espécies clínicas de leveduras do gênero *Candida*.

6 CONCLUSÃO

- Três lotes foram produzidos com três crioprotetores distintos (*Skim Milk* 20% + trealose 10%, *Skim Milk* 20% e *Skim Milk* 20% + maltose 10%) e foram considerados suficientemente homogêneos;
- Os testes de estabilidade a longo prazo determinaram validade de pelo menos 12 meses para os três lotes, e o *Skim Milk* 20% + maltose 10% foi o crioprotetor que apresentou melhores resultados;
- Os testes de estabilidade a curto prazo estabeleceram a temperatura de (4 ± 2) °C com suficiente estabilidade apenas para os lotes *Skim Milk* 20% + trealose 10% e *Skim Milk* 20% + maltose 10%;
- O sistema automatizado VITEK[®] 2 não foi eficaz para a caracterização fenotípica das leveduras do gênero *Saccharomyces* estudadas;
- A limitação das informações do banco de dados do método de MALDI-TOF MS impactou nos resultados para a caracterização fenotípica;
- A análise de HRM foi capaz de diferenciar a levedura *S. kudriavzevii* das demais, sendo assim, um método satisfatório para a sua identificação inequívoca;
- O crioprotetor escolhido para o estabelecimento do MRC foi o *Skim Milk* 20% + maltose 10%, e o lote 121940001 teve valor de propriedade quantitativo e sua incerteza estabelecido de $36 \pm 4,93$ UFC/100 µL e valor de propriedade qualitativa (pureza e autenticidade) aprovadas.
- Contribuição dos novos espectros, das espécies de leveduras estudadas, na biblioteca do equipamento MALDI TOF MS.

7 PRODUTO TECNOLÓGICO

O produto tecnológico desenvolvido nesse trabalho foi o MRC da levedura *S. kudriavzevii*. O certificado que acompanha o produto está apresentado no **APÊNDICE D**.

Todas as etapas da produção do MRC foram desenvolvidas no Setor de Fungos, no INCQS, conforme a norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017, além de seguir as orientações da norma técnica ABNT ISO GUIA 31, do guia ABNT ISO GUIA 35 e da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

O Setor de Fungos do INCQS possui o sistema da qualidade implementado e possui os ensaios de viabilidade, pureza e autenticação de fungos filamentosos e leveduras acreditados pela ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, desde 2021, o que facilitou o desenvolvimento do MRC.

A acreditação pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 seria um próximo passo para a produção de MR e MRC.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 35**. Materiais de referência — Guia para caracterização e avaliação da homogeneidade e estabilidade. Rio de Janeiro: ABNT, 2020.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 30**. Termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 31**. Materiais de referência - Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada. Rio de Janeiro: ABNT, 2017a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017b.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/ISO/IEC 17034**. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2017c.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/ISO 20387:2020**. Biotecnologia - Biobanco - Requisitos gerais para biobancos. Rio de Janeiro: ABNT, 2020.
- ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 344-55, 2011.
- AUBERTINE, C. L.; RIVERA, M.; ROHAN, S.M.; LARONE, D. H. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 227-8, 2006.
- BAETS, De L. et al. Certification of a reference material with *Salmonella enteritidis* (NCTC 12694) at a level of 5 colony forming units on nutrient agar and 4 colony forming units on xylose lysine deoxycholate agar, IRMM-352. **JRC Publications Repository**, 2008.
- BAETS, De L.; MEEUS, N.; SCHIMMEL, H. Certification of a reference material with *Candida albicans* (NCPF 3179) at a target level of 1000 colony forming units per material sphere IRMM-354. **JRC Publications Repository**, 2009.
- BICA, V. C.; KICH, J. N.; COSTA, J. M. N. Identificação dos produtores de Materiais de Referência Certificados no Brasil. **8º Congresso Brasileiro de Metrologia**, Bento Gonçalves/RS, 2015.
- BLANQUET, S. Effects of cryoprotectants on the viability and activity of freeze-dried recombinant yeast a novel oral drug delivery systems assessed by na

artificial digestive system. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 32-9, 2005.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, p. 124-130, 2013a.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Produção de materiais de referência para avaliação de métodos microbiológicos em alimentos: Estafilococos coagulase positiva e *Listeria* spp. em leite em pó. **Revista Analytica**, v. 63, p. 60-70, 2013b.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Produção de material de referência para ensaio de proficiência de enumeração de *Bacillus cereus* em leite. **Vigilância Sanitária em Debate**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 39-45, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: **Rename**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2020. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/24/Rename-2020-final.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

ÇAKTÜ, K.; TÜRKOĞLU, E.A. Microbial culture collections: The essential resources for life. **Gazi University Journal of Science and Technology**, v. 24, p. 175–80, 2011.

CARBONNELLE, E.; NASSIF, X. Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. **Medecine Sciences**, v. 10, p. 882-8, 2011.

CARDOSO, M.H.W.M. et al. Preparação de um Material de Referência Certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 429-38, 2010.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 263-8, 1991.

COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-22, 2009.

COSTA, L. V.; LAGE, R. V.; BRANDAO, M. L. L.; RAMOS, J. N.; VIEIRA, V. V. Expansion of MALDI-TOF MS database for identification of *Bacillus* and related genera from microbiota of pharmaceutical clean rooms. In: II Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas, 2021. **Anais do II Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas**. Biochemie.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J. F. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**., v. 242, p. 1-10, 1987.

CROWE, L.M. et al. Effect of carbohydrates on membrane stability at low water activities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.769, p.141-50, 1984.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 380-407, 2012.

DAY, J.G.; STACEY, G.N. Freeze-drying of yeast cultures. In: **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2007.

DIFCO & BBL MANUAL. **Manual of microbiological culture media**. Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA. Disponível em: <<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9572>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6 ed. Brasília: ANVISA, v. 1, p. 459, 2019.

FERRER, C. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2873-79, 2001.

FIOCRUZ. **Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://cfrvs.fiocruz.br/>>. Acesso em: 14 de jan. 2022a.

FIOCRUZ. **Centro de Recursos Biológicos em Saúde**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/crb-saude>> Acesso em: 14 de jan. 2022b.

FIOCRUZ. **Biobanco**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/biobanco-covid-19-da-fiocruz>> Acesso em: 14 de jan. 2022c.

HEITMANN M.; ZANNINI E.; ARENDT E. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 7, p. 1152-64, 2018.

HERRMANN, M. G.; DURTSCHI, J. D.; WITWER, C. T.; VOELKERDING, K. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 1544-8, 2007.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.

INCQS. **Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**.

Apresentação. Disponível em:

<https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57>. Acesso em: 14 de jan. 2022.

INFORMAÇÃO de produtos de sensibilidade. In: **VITEK 2 technology: manual do utilizador do software**. Durham: Biomérieux, Cap. 6, 2008.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)**. 1. ed. Rio de Janeiro, p. 28, 2012.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Laboratórios acreditados**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inmetro/pt-br/assuntos/acreditacao/organismos-acreditados/produtores-de-materiais-de-referencia/acreditados>>. Acesso em: 22 nov. 2021.

IRINYI, L. et al. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. **Fungal Biology**, v. 120, p. 125-36, 2016.

JANNING, B. et al. Development, production and certification of microbiological reference materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 240-5, 1995.

KURTZMAN, C. P. **The yeasts: A taxonomic study**: 04-2011; 5 ed. Langue: Anglais; Ouvrage p. 733; Vol 2; Cap 61 *Saccharomyces* Meyen ex Reess, 2011a.

KURTZMAN, C. P. **The yeasts: A taxonomic study**: 04-2011; 5 ed. Langue: Anglais; Ouvrage p. 740; Vol 2; Cap 61 *Saccharomyces kudriavzevii*, 2011b.

LAY JR. O. MALDI – TOF Mass Spectrometry of Bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 94-172, 2001.

LIMA, D. T. **Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas**. 2011. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2011.

LIN, J. T. et al. High-resolution melting analysis for the detection of SLC25A13 gene mutations in Taiwan. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 460-5, 2011.

LITI, G.; BARTON, D. B.; LOUIS, E. J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. **Genetics**, v. 174, p. 839-50, 2006.

MOREIRA, F. M. et al. Identification of filamentous fungi in a pharmaceutical industry using matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). In: 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021. **Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2021.

MOREIRA, F. M. et al. Identificação de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Científica do Centro Universitário de Barra Mansa**, v. 24, n. 46, p. 124-44, 2022.

- MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods, Amsterdam**, v. 66, n. 2, p.183-93, 2006.
- MOURA, S. S.; COSTA, R. R. S. Estudo da utilização de materiais de referencia nas análises de água por laboratórios envolvidos no sistema de acreditação. **Produção**, v. 19, n. 2, p. 304-16, 2009.
- MUIR, A.; HARRISON, E.; WHEALS, A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, p. 552-63, 2011.
- NADAI, C. et al. New rapid PCR protocol based on high-resolution melting analysis to identify *Saccharomyces cerevisiae* and other species within its genus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 1232-42, 2018.
- NARDI, T. et al. A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, p. 168–73, 2006.
- NAUMOV, G.I. et al. Three new species in the *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1931-42, 2000.
- NINGHUI, G. et al. PCR and High-Resolution Melting for rapid identification of yeasts. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, vol. 45, p. 680-5, 2015.
- POSTERARO, B. et al. Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? A Meta-analysis of their accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 2439-50, 2015.
- QUINTILLA, R. et al. MALDI-TOF MS as tool to identify foodborne yeasts and yeast-like fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 109-118, 2018.
- RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 655, 2016.
- REED, G. H.; KENT, J. O.; WITTEWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, v. 8, p. 597-608, 2007.
- ROSAS, C.O. et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. **Revista Insituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 15-22, 2010.

ROSAS, C.O. et al. Microbiological reference material (bacterial and fungal domains): Definition, production rules, use and need for establishment in Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 201-08, 2019.

SCHUBERT S.; KOSTRZEWA M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 23, p. 17-20, 2017.

SILVA, I. C. et al. Produção de itens de ensaio de proficiência contendo bactérias em matriz frango utilizando a técnica de liofilização. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 9, p. 59-67, 2021.

SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. Preservation Techniques. In: **The Preservation and Maintenance of Living Fungi**. 1. ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, p. 12-20, 1983.

SOUTO, A. S. S. **Estabelecimento de fungos como materiais de referência certificados e seleção de métodos de excelência para caracterização das diferentes espécies**. 2018. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 42 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

TOMAZ, P. R. X.; SANTOS, J. R.; SANTOS, P. C. J. L. Applicability aspects of the melting curve analysis. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 47, 2015.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Crescimento Microbiano. In: **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess, In. Kurtzman, C. P.; Fell, J. W.; Boekhout, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5. ed. Ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 733-746, 2011.

WOELDERS, H., MATHIJS, A., ENGEL, B. Effects of trealose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness of sperm after freezing and trawing. **Cryobiology**, v. 35, p. 193-5, 1997.

APÊNDICE A - Planejamento da produção de lote piloto de Material de Referência Certificado do micro-organismo *Saccharomyces kudriavzevii* CFRVS MRC 40001, com *Skim Milk* a 20% + trealose 2% como crioprotetor.

INTRODUÇÃO

O gênero *Saccharomyces*

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* desempenham um papel importante em vários campos da ciência biológica. São utilizadas nos processos de fermentação em todo o mundo e destacam-se como modelo de organismos eucarióticos não só na bioquímica como também para genômica (MOHD AZHAR et al., 2017).

A levedura *Saccharomyces kudriavzevii* é preconizada para o ensaio microbiológico do antibiótico nistatina na Farmacopeia Brasileira (2019) e na Farmacopeia Americana (2019). Além disso, é estabelecida para o controle de qualidade do meio de cultura ágar antibiótico número 19 (DIFCO; BBL, 2020).

Material de Referência Certificado

Os materiais de referência (MR) e materiais de referência certificado (MRC) visam garantir confiabilidade de métodos analíticos através da verificação de exatidão, sendo assim, importantes para a garantia de qualidade dos resultados de um laboratório. Atualmente, no Brasil, não existem produtores acreditados de MR e/ou MRC de leveduras, e para o seu uso, os laboratórios dependem de fornecedores internacionais. Para aquisição desses materiais microbiológicos as dificuldades encontradas são devido ao alto custo de importação, além das barreiras sanitárias e comerciais (ROSAS et al., 2019).

Um MR é um material suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas, que é suficientemente estabelecido para o seu uso em um processo de medição. Essas propriedades podem ser qualitativas ou quantitativas (ABNT, 2016).

O MRC é um MR, caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um

certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica (ABNT, 2012).

A rastreabilidade metrológica é a propriedade de um resultado de medição, pelo qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (INMETRO, 2012).

O desenvolvimento, produção e o uso de MRC em ensaios microbiológicos tem uma dificuldade a mais devido a questões relacionadas a estabilidade e a viabilidade dos micro-organismos, sendo assim, um desafio para os possíveis produtores de MRC para esse fim, no entanto, são indispensáveis para o controle de qualidade em análises microbiológicas (JANNING, 1995).

ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Instituto Nacional de Controle em Saúde (INCQS)

Departamento de Microbiologia (DM)

Laboratório de Micro-organismos de Referência (LMR)

Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS)

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: 21.040-900

FINANCIAMENTO

A produção do material *Saccharomyces kudriavzevii* CFRVS MRC 40001 será realizada com recursos do INCQS, em parceria com o Instituto Nacional de Infectologia (INI) para a identificação fenotípica, pelo método *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS).

OBJETIVOS

- Produzir *S. kudriavzevii* como MRC para utilização em laboratórios de controle de qualidade em produtos;

- Contribuir para o avanço do desenvolvimento tecnológico do processo de produção de MRC na área microbiológica;
- Diminuir a dependência brasileira por cepas disponíveis em coleções internacionais, reduzindo, assim, o alto custo que esse processo apresenta.

PARTICIPANTES

O Setor de Fungos será responsável pela produção do MRC, assim como pelas análises de homogeneidade, de estabilidade e de caracterização.

PROCESSAMENTO

O valor de propriedade estabelecido para o MRC será o quantitativo de até 100 UFC por alíquota de 100 µL.

Será realizado o cultivo da levedura a partir de um estoque criopreservado. A partir deste cultivo será preparada uma suspensão em leite desnatado (*Skim Milk*) na concentração de 20%, um agente crioprotetor, permitindo a manutenção da viabilidade das células das leveduras após os procedimentos de preservação.

Serão distribuídas alíquotas de 0,6 mL da suspensão final em frascos estéreis e a sequência de distribuição será monitorada do primeiro até o último frasco envasado. Após esta etapa os frascos serão congelados a -70 °C por 24 h e então serão submetidos à liofilização. Os frascos de vidro serão fechados sob vácuo, com uma tampa de borracha, e armazenados a -20 °C durante as análises de homogeneidade e estabilidade a curto e longo prazo.

A rotulagem dos frascos será realizada de forma que fiquem registrados o nome da cepa, o número de acesso, a ordem de envase e a data do ensaio. No total, será produzido um lote com 200 frascos ampola, numerados de 1 a 200.

PROCEDIMENTOS

Contagem das unidades formadoras de colônias (caracterização quantitativa)

Plaqueamento e contagem de colônias serão realizados em YMA. O MRC será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril. A partir disso, pelo método de *spread plate*, cinco alíquotas de 100 µL serão distribuídos em cinco placas de YMA. As placas serão incubadas a (25 ± 2) °C durante 36 a 72 h. Após a incubação, as colônias em placas individuais serão contadas. A contagem de cada placa não deverá ultrapassar 100 UFC.

Estudo de homogeneidade

Os frascos para o estudo da homogeneidade serão avaliados a partir do estoque a -20 °C. Serão produzidos 200 frascos, com isso, o número total determinado de frascos a serem utilizados no estudo de homogeneidade será de dez frascos, que serão selecionados por amostragem aleatória. Os frascos serão mantidos à temperatura ambiente durante 30 min antes de cada análise. Após esse tempo, o líófilo será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril e homogeneizado vigorosamente, deixando em repouso por 30 min à temperatura ambiente. A homogeneidade do lote será medida através da determinação dos valores de UFC por alíquota de 100 µL de cada frasco, usando contagem de colônias em YMA.

Avaliação do estudo de homogeneidade

A avaliação da homogeneidade será realizada através da aplicação do teste estatístico recomendado pelo ABNT ISO GUIA 35, análise da variância (Anova) de fator único, utilizando o programa Microsoft Excel 2013. A partir dos dados gerados na Anova, será calculada a incerteza relativa à homogeneidade, calculada segundo a expressão:

$$S_{bb} = \sqrt{(MQ_{entre} - MQ_{dentro}) / n}$$

Onde o desvio padrão entre e dentro dos frascos “ S_{bb} ” corresponde ao desvio padrão entre (MQ_{entre}) e dentro (MQ_{dentro}) dos frascos e “ n ” o número de

replicatas que será inserida ao final do estudo no processo de certificação do MR.

Estudo de estabilidade

O controle da estabilidade em longo prazo será realizado semanalmente no primeiro mês, a partir da data da produção do MRC. A partir do segundo mês até o terceiro, a frequência do teste passará a ser quinzenal e a partir do quarto mês, mensal, até completar um ano. A cada teste serão selecionadas aleatoriamente três unidades do lote preparado.

O teste da estabilidade em curto prazo será realizado nas temperaturas: 4 °C e 35 °C, que simulam possíveis temperaturas de transporte. A cada dia, três frascos serão transferidos do *freezer* a -20 °C para a temperatura proposta, ou seja, serão realizados dois diferentes testes (duas diferentes temperaturas) para cada lote produzido. Após 7 dias, os 21 frascos serão analisados juntos, sob as mesmas condições de análise.

Avaliação do estudo de estabilidade

A avaliação estatística dos resultados será realizada, conforme recomendado pelo ABNT ISO GUIA 35, através da análise de regressão linear, a fim de observar se a regressão dos valores obtidos no estudo apresenta alguma tendência ao longo do tempo.

Para o cálculo da incerteza do teste de estabilidade em longo prazo, o valor do erro padrão será multiplicado pelo tempo da análise, que serão 12 meses.

Para o cálculo da incerteza do teste de estabilidade em curto prazo, o valor do erro padrão será multiplicado pelo número de dias da análise, que serão 7 dias.

CARACTERIZAÇÃO DO LOTE

Caracterização qualitativa

Para a avaliação do valor de propriedade qualitativo será realizada a confirmação da identidade dos micro-organismos, através dos métodos fenotípicos e genotípicos.

- **Caracterização Fenotípica**

A autenticação fenotípica de *S. kudriavzevii* será realizada com base nos resultados das observações das características morfológicas coloniais e celulares e de características fisiológicas e bioquímicas (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

Após a seleção das cepas, serão realizados repiques dos fungos em placas contendo YMA, a fim de verificar a pureza das cepas.

A avaliação fisiológica das cepas será realizada utilizando o método automatizado Vitek 2 (Biomérieux, França) no qual será utilizado o cartão YST para identificação de leveduras (INFORMAÇÃO, 2008).

MALDI-TOF MS é uma tecnologia que aborda a análise proteômica microbiana. Esse método é rápido, de baixo custo, simples e aplicável para inúmeros micro-organismo, incluindo bactérias, arqueas e fungos. A capacidade dessa técnica de diferenciar a nível de espécies tem sido útil na descrição de novas espécies (LAY JR., 2001, CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

As análises com MALDI-TOF MS serão realizadas em colaboração com Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fiocruz, a partir do procedimento descrito pelo equipamento MALDI Biotyper (MALDI-TOF/MS, Bruker, Massachusetts, EUA).

- **Caracterização Genotípica**

Extração de DNA das leveduras

O primeiro procedimento para a caracterização genotípica é a extração do DNA das leveduras, para isso será utilizado o procedimento descrito por Ferrer et al. (2001). A quantificação será realizada por meio do espectrofotômetro NanoDrop.

Análise de HRM

O procedimento será realizado segundo Nardi et al. (2006) com adaptações. A curva de *melting* será obtida através dos seguintes passos: a aquisição de dados será realizada para cada aumento de 0,2 °C na temperatura, com uma etapa de 10 s, com a temperatura variando de 65 a 95 °C. O equipamento utilizado será o modelo QuantStudio 7 Flex da marca Thermo Fisher Scientific.

REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 30**. Termos e definições relacionados com materiais de referência. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 35**. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2020.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 380-407, 2012.

DIFCO & BBL MANUAL. **Manual of microbiological culture media**. Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA. Disponível em: <<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9572>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6 ed. Brasília: ANVISA, 2019.

FERRER, C. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2873-79, 2001.

INFORMAÇÃO de produtos de sensibilidade. In: **VITEK 2 technology: manual do utilizador do software**. Durham: Biomérieux, Cap. 6, 2008.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)**. 1. ed. Rio de Janeiro, p. 28, 2012.

JANNING, B. et al. Development, production and certification of microbiological reference materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 240-245, 1995.

MOHD AZHAR, S.H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

LAY, JR. O. MALDI – TOF Mass Spectrometry of Bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 172-94, 2001.

NADAI, C. et al. New rapid PCR protocol based on high-resolution melting analysis to identify *Saccharomyces cerevisiae* and other species within its genus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 1232-42, 2018.

NARDI, T. et al. A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, p. 168–73, 2006.

ROSAS, C. O. et al. Microbiological reference material (bacterial and fungal domains): Definition, production rules, use and need for establishment in Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 201-08, 2019.

THE UNITED States Pharmacopoeia. 42 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess, In. KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5. ed. Ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 733-746, 2011.

APÊNDICE B - Planejamento da produção de lote piloto de Material de Referência Certificado do micro-organismo *Saccharomyces kudriavzevii* CFRVS MRC 40001, com *Skim Milk* a 20% como crioprotetor.

INTRODUÇÃO

O gênero *Saccharomyces*

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* desempenham um papel importante em vários campos da ciência biológica. São utilizadas nos processos de fermentação em todo o mundo e destacam-se como modelo de organismos eucarióticos não só na bioquímica como também para genômica (MOHD AZHAR et al., 2017).

A levedura *Saccharomyces kudriavzevii* é preconizada para o ensaio microbiológico do antibiótico nistatina na Farmacopeia Brasileira (2019) e na Farmacopeia Americana (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019). Além disso, é estabelecida para o controle de qualidade do meio de cultura ágar antibiótico número 19 (DIFCO; BBL, 2020).

Material de Referência Certificado

Os materiais de referência (MR) e materiais de referência certificado (MRC) visam garantir confiabilidade de métodos analíticos através da verificação de exatidão, sendo assim, importantes para a garantia de qualidade dos resultados de um laboratório. Atualmente, no Brasil, não existem produtores acreditados de MR e/ou MRC de leveduras, e para o seu uso, os laboratórios dependem de fornecedores internacionais. Para aquisição desses materiais microbiológicos as dificuldades encontradas são devido ao alto custo de importação, além das barreiras sanitárias e comerciais (ROSAS et al., 2019).

Um MR é um material suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas, que é suficientemente estabelecido para o seu uso em um processo de medição. Essas propriedades podem ser qualitativas ou quantitativas (ABNT, 2016).

O MRC é um MR, caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um

certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica (ABNT, 2012).

A rastreabilidade metrológica é a propriedade de um resultado de medição, pelo qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (INMETRO, 2012).

O desenvolvimento, produção e o uso de MRC em ensaios microbiológicos tem uma dificuldade a mais devido a questões relacionadas a estabilidade e a viabilidade dos micro-organismos, sendo assim, um desafio para os possíveis produtores de MRC para esse fim, no entanto, são indispensáveis para o controle de qualidade em análises microbiológicas (JANNING, 1995).

ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Instituto Nacional de Controle em Saúde (INCQS)

Departamento de Microbiologia (DM)

Laboratório de Micro-organismos de Referência (LMR)

Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS)

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: 21.040-900

FINANCIAMENTO

A produção do material *Saccharomyces kudriavzevii* CFRVS MRC 40001 será realizada com recursos do INCQS, em parceria com o Instituto Nacional de Infectologia (INI) para a identificação fenotípica, pelo método *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS).

OBJETIVOS

- Produzir *S. kudriavzevii* como MRC para utilização em laboratórios de controle de qualidade em produtos;

- Contribuir para o avanço do desenvolvimento tecnológico do processo de produção de MRC na área microbiológica;
- Diminuir a dependência brasileira por cepas disponíveis em coleções internacionais, reduzindo, assim, o alto custo que esse processo apresenta.

PARTICIPANTES

O Setor de Fungos será responsável pela produção do MRC, assim como pelas análises de homogeneidade, de estabilidade e de caracterização.

PROCESSAMENTO

O valor de propriedade estabelecido para o MRC será o quantitativo de até 100 UFC por alíquota de 100 µL.

Será realizado o cultivo da levedura a partir de um estoque criopreservado. A partir deste cultivo será preparada uma suspensão em leite desnatado (*Skim Milk*) na concentração de 20%, um agente crioprotetor, permitindo a manutenção da viabilidade das células das leveduras após os procedimentos de preservação.

Serão distribuídas alíquotas de 0,6 mL da suspensão final em frascos estéreis e a sequência de distribuição será monitorada do primeiro até o último frasco envasado. Após esta etapa os frascos serão congelados a -70 °C por 24 h e então serão submetidos à liofilização. Os frascos de vidro serão fechados sob vácuo, com uma tampa de borracha, e armazenados a -20 °C durante as análises de homogeneidade e estabilidade a curto e longo prazo.

A rotulagem dos frascos será realizada de forma que fiquem registrados o nome da cepa, o número de acesso, a ordem de envase e a data do ensaio. No total, será produzido um lote com 200 frascos ampola, numerados de 1 a 200.

PROCEDIMENTOS

Contagem das unidades formadoras de colônias (caracterização quantitativa)

Plaqueamento e contagem de colônias serão realizados em YMA. O MRC será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril. A partir disso, pelo método de *spread plate*, cinco alíquotas de 100 µL serão distribuídos em cinco placas de YMA. As placas serão incubadas a (25 ± 2) °C durante 36 a 72 h. Após a incubação, as colônias em placas individuais serão contadas. A contagem de cada placa não deverá ultrapassar 100 UFC.

Estudo de homogeneidade

Os frascos para o estudo da homogeneidade serão avaliados a partir do estoque a -20 °C. Serão produzidos 200 frascos, com isso, o número total determinado de frascos a serem utilizados no estudo de homogeneidade será de dez frascos, que serão selecionados por amostragem aleatória. Os frascos serão mantidos à temperatura ambiente durante 30 min antes de cada análise. Após esse tempo, o líófilo será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril e homogeneizado vigorosamente, deixando em repouso por 30 min à temperatura ambiente. A homogeneidade do lote será medida através da determinação dos valores de UFC por alíquota de 100 µL de cada frasco, usando contagem de colônias em YMA.

Avaliação do estudo de homogeneidade

A avaliação da homogeneidade será realizada através da aplicação do teste estatístico recomendado pelo ABNT ISO GUIA 35, análise da variância (Anova) de fator único, utilizando o programa Microsoft Excel 2013. A partir dos dados gerados na Anova, será calculada a incerteza relativa à homogeneidade, calculada segundo a expressão:

$$S_{bb} = \sqrt{(MQ_{entre} - MQ_{dentro}) / n}$$

Onde o desvio padrão entre e dentro dos frascos “ S_{bb} ” corresponde ao desvio padrão entre (MQ_{entre}) e dentro (MQ_{dentro}) dos frascos e “ n ” o número de

replicatas que será inserida ao final do estudo no processo de certificação do MR.

Estudo de estabilidade

O controle da estabilidade em longo prazo será realizado semanalmente no primeiro mês, a partir da data da produção do MRC. A partir do segundo mês até o terceiro, a frequência do teste passará a ser quinzenal e a partir do quarto mês, mensal, até completar um ano. A cada teste serão selecionadas aleatoriamente três unidades do lote preparado.

O teste da estabilidade em curto prazo será realizado nas temperaturas: 4 °C e 35 °C, que simulam possíveis temperaturas de transporte. A cada dia, três frascos serão transferidos do *freezer* a -20 °C para a temperatura proposta, ou seja, serão realizados dois diferentes testes (duas diferentes temperaturas) para cada lote produzido. Após 7 dias, os 21 frascos serão analisados juntos, sob as mesmas condições de análise.

Avaliação do estudo de estabilidade

A avaliação estatística dos resultados será realizada, conforme recomendado pelo ABNT ISO GUIA 35, através da análise de regressão linear, a fim de observar se a regressão dos valores obtidos no estudo apresenta alguma tendência ao longo do tempo.

Para o cálculo da incerteza do teste de estabilidade em longo prazo, o valor do erro padrão será multiplicado pelo tempo da análise, que serão 12 meses.

Para o cálculo da incerteza do teste de estabilidade em curto prazo, o valor do erro padrão será multiplicado pelo número de dias da análise, que serão 7 dias.

CARACTERIZAÇÃO DO LOTE

Caracterização qualitativa

Para a avaliação do valor de propriedade qualitativo será realizada a confirmação da identidade dos micro-organismos, através dos métodos fenotípicos e genotípicos.

- **Caracterização Fenotípica**

A autenticação fenotípica de *S. kudriavzevii* será realizada com base nos resultados das observações das características morfológicas coloniais e celulares e de características fisiológicas e bioquímicas (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

Após a seleção das cepas, serão realizados repiques dos fungos em placas contendo YMA, a fim de verificar a pureza das cepas.

A avaliação fisiológica das cepas será realizada utilizando o método automatizado Vitek 2 (Biomérieux, França) no qual será utilizado o cartão YST para identificação de leveduras (INFORMAÇÃO, 2008).

MALDI-TOF MS é uma tecnologia que aborda a análise proteômica microbiana. Esse método é rápido, de baixo custo, simples e aplicável para inúmeros micro-organismo, incluindo bactérias, arqueas e fungos. A capacidade dessa técnica de diferenciar a nível de espécies tem sido útil na descrição de novas espécies (LAY JR., 2001, CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

As análises com MALDI-TOF MS serão realizadas em colaboração com Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fiocruz, a partir do procedimento descrito pelo equipamento MALDI Biotyper (MALDI-TOF/MS, Bruker, Massachusetts, EUA).

- **Caracterização Genotípica**

Extração de DNA das leveduras

O primeiro procedimento para a caracterização genotípica é a extração do DNA das leveduras, para isso será utilizado o procedimento descrito por Ferrer e colaboradores (2001). A quantificação será realizada por meio do espectrofotômetro NanoDrop.

Análise de HRM

O procedimento será realizado segundo Nardi e colaboradores (2006) com adaptações. A curva de *melting* será obtida através dos seguintes passos: a aquisição de dados será realizada para cada aumento de 0, 2 °C na temperatura, com uma etapa de 10 s, com a temperatura variando de 65 a 95 °C. O equipamento utilizado será o modelo QuantStudio 7 Flex da marca Thermo Fisher Scientific.

REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 30**. Termos e definições relacionados com materiais de referência. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 35**. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2020.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 380-407, 2012.

DIFCO & BBL MANUAL. **Manual of microbiological culture media**. Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA. Disponível em: <<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9572>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6 ed. Brasília: ANVISA, 2019.

FERRER, C. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2873-79, 2001.

INFORMAÇÃO de produtos de sensibilidade. In: **VITEK 2 technology: manual do utilizador do software**. Durham: Biomérieux, Cap. 6, 2008.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)**. 1. ed. Rio de Janeiro, p. 28, 2012.

JANNING, B. et al. Development, production and certification of microbiological reference materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 240-5, 1995.

MOHD AZHAR, S.H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

LAY, JR. O. MALDI – TOF Mass Spectrometry of Bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 172-94, 2001.

NADAI, C. et al. New rapid PCR protocol based on high-resolution melting analysis to identify *Saccharomyces cerevisiae* and other species within its genus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 1232-42, 2018.

NARDI, T. et al. A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, p. 168–73, 2006.

ROSAS, C. O. et al. Microbiological reference material (bacterial and fungal domains): Definition, production rules, use and need for establishment in Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 201-208, 2019.

THE UNITED States Pharmacopoeia. 42 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess, In. KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5. ed. Ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 733-46, 2011.

APÊNDICE C - Planejamento da produção de lote piloto de Material de Referência Certificado do micro-organismo *Saccharomyces kudriavzevii* CFRVS MRC 40001, com *Skim Milk* a 20% + maltose 2% como crioprotetor.

INTRODUÇÃO

O gênero *Saccharomyces*

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* desempenham um papel importante em vários campos da ciência biológica. São utilizadas nos processos de fermentação em todo o mundo e destacam-se como modelo de organismos eucarióticos não só na bioquímica como também para genômica (MOHD AZHAR et al., 2017).

A levedura *Saccharomyces kudriavzevii* é preconizada para o ensaio microbiológico do antibiótico nistatina na Farmacopeia Brasileira (2019) e na Farmacopeia Americana (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019). Além disso, é estabelecida para o controle de qualidade do meio de cultura ágar antibiótico número 19 (DIFCO; BBL, 2020).

Material de Referência Certificado

Os materiais de referência (MR) e materiais de referência certificado (MRC) visam garantir confiabilidade de métodos analíticos através da verificação de exatidão, sendo assim, importantes para a garantia de qualidade dos resultados de um laboratório. Atualmente, no Brasil, não existem produtores acreditados de MR e/ou MRC de leveduras, e para o seu uso, os laboratórios dependem de fornecedores internacionais. Para aquisição desses materiais microbiológicos as dificuldades encontradas são devido ao alto custo de importação, além das barreiras sanitárias e comerciais (ROSAS et al., 2019).

Um MR é um material suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas, que é suficientemente estabelecido para o seu uso em um processo de medição. Essas propriedades podem ser qualitativas ou quantitativas (ABNT, 2016).

O MRC é um MR, caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica (ABNT, 2012).

A rastreabilidade metrológica é a propriedade de um resultado de medição, pelo qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (INMETRO, 2012).

O desenvolvimento, produção e o uso de MRC em ensaios microbiológicos tem uma dificuldade a mais devido a questões relacionadas a estabilidade e a viabilidade dos micro-organismos, sendo assim, um desafio para os possíveis produtores de MRC para esse fim, no entanto, são indispensáveis para o controle de qualidade em análises microbiológicas (JANNING, 1995).

ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Instituto Nacional de Controle em Saúde (INCQS)

Departamento de Microbiologia (DM)

Laboratório de Micro-organismos de Referência (LMR)

Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS)

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: 21.040-900

FINANCIAMENTO

A produção do material *Saccharomyces kudriavzevii* CFRVS MRC 40001 será realizada com recursos do INCQS, em parceria com o Instituto Nacional de Infectologia (INI) para a identificação fenotípica, pelo método *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS).

OBJETIVOS

- Produzir *S. kudriavzevii* como MRC para utilização em laboratórios de controle de qualidade em produtos;
- Contribuir para o avanço do desenvolvimento tecnológico do processo de produção de MRC na área microbiológica;
- Diminuir a dependência brasileira por cepas disponíveis em coleções internacionais, reduzindo, assim, o alto custo que esse processo apresenta.

PARTICIPANTES

O Setor de Fungos será responsável pela produção do MRC, assim como pelas análises de homogeneidade, de estabilidade e de caracterização.

PROCESSAMENTO

O valor de propriedade estabelecido para o MRC será o quantitativo de até 100 UFC por alíquota de 100 µL.

Será realizado o cultivo da levedura a partir de um estoque criopreservado. A partir deste cultivo será preparada uma suspensão em leite desnatado (*Skim Milk*) na concentração de 20% mais a maltose na concentração de 10%, um agente crioprotetor, permitindo a manutenção da viabilidade das células das leveduras após os procedimentos de preservação.

Serão distribuídas alíquotas de 0,6 mL da suspensão final em frascos estéreis e a sequência de distribuição será monitorada do primeiro até o último frasco envasado. Após esta etapa os frascos serão congelados a -70 °C por 24 h e então serão submetidos à liofilização. Os frascos de vidro serão fechados sob vácuo, com uma tampa de borracha, e armazenados a -20 °C durante as análises de homogeneidade e estabilidade a curto e longo prazo.

A rotulagem dos frascos será realizada de forma que fiquem registrados o nome da cepa, o número de acesso, a ordem de envase e a data do ensaio. No total, será produzido um lote com 200 frascos ampola, numerados de 1 a 200.

PROCEDIMENTOS

Contagem das unidades formadoras de colônias (caracterização quantitativa)

Plaqueamento e contagem de colônias serão realizados em YMA. O MRC será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril. A partir disso, pelo método de *spread plate*, cinco alíquotas de 100 µL serão distribuídos em cinco placas de YMA. As placas serão incubadas a (25 ± 2) °C durante 36 a 72 h. Após a incubação, as colônias em placas individuais serão contadas. A contagem de cada placa não deverá ultrapassar 100 UFC.

Estudo de homogeneidade

Os frascos para o estudo da homogeneidade serão avaliados a partir do estoque a -20 °C. Serão produzidos 200 frascos, com isso, o número total determinado de frascos a serem utilizados no estudo de homogeneidade será de dez frascos, que serão selecionados por amostragem aleatória. Os frascos serão mantidos à temperatura ambiente durante 30 min antes de cada análise. Após esse tempo, o líófilo será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril e homogeneizado vigorosamente, deixando em repouso por 30 min à temperatura ambiente. A homogeneidade do lote será medida através da determinação dos valores de UFC por alíquota de 100 µL de cada frasco, usando contagem de colônias em YMA.

Avaliação do estudo de homogeneidade

A avaliação da homogeneidade será realizada através da aplicação do teste estatístico recomendado pelo ABNT ISO GUIA 35, análise da variância (Anova) de fator único, utilizando o programa Microsoft Excel 2013. A partir dos dados gerados na Anova, será calculada a incerteza relativa à homogeneidade, calculada segundo a expressão:

$$S_{bb} = \sqrt{(MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}) / n}$$

Onde o desvio padrão entre e dentro dos frascos “S_{bb}” corresponde ao desvio padrão entre (MQ_{entre}) e dentro (MQ_{dentro}) dos frascos e “n” o número de replicatas que será inserida ao final do estudo no processo de certificação do MR.

Estudo de estabilidade

O controle da estabilidade em longo prazo será realizado semanalmente no primeiro mês, a partir da data da produção do MRC. A partir do segundo mês até o terceiro, a frequência do teste passará a ser quinzenal e a partir do quarto mês, mensal, até completar um ano. A cada teste serão selecionadas aleatoriamente três unidades do lote preparado.

O teste da estabilidade em curto prazo será realizado nas temperaturas: 4 °C e 35 °C, que simulam possíveis temperaturas de transporte. A cada dia, três frascos serão transferidos do *freezer* a -20 °C para a temperatura proposta, ou seja, serão realizados dois diferentes testes (duas diferentes temperaturas) para cada lote produzido. Após 7 dias, os 21 frascos serão analisados juntos, sob as mesmas condições de análise.

Avaliação do estudo de estabilidade

A avaliação estatística dos resultados será realizada, conforme recomendado pelo ABNT ISO GUIA 35, através da análise de regressão linear, a fim de observar se a regressão dos valores obtidos no estudo apresenta alguma tendência ao longo do tempo.

Para o cálculo da incerteza do teste de estabilidade em longo prazo, o valor do erro padrão será multiplicado pelo tempo da análise, que serão 12 meses.

Para o cálculo da incerteza do teste de estabilidade em curto prazo, o valor do erro padrão será multiplicado pelo número de dias da análise, que serão 7 dias.

CARACTERIZAÇÃO DO LOTE

Caracterização qualitativa

Para a avaliação do valor de propriedade qualitativo será realizada a confirmação da identidade dos micro-organismos, através dos métodos fenotípicos e genotípicos.

- **Caracterização Fenotípica**

A autenticação fenotípica de *S. kudriavzevii* será realizada com base nos resultados das observações das características morfológicas coloniais e celulares e de características fisiológicas e bioquímicas (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

Após a seleção das cepas, serão realizados repiques dos fungos em placas contendo YMA, a fim de verificar a pureza das cepas.

A avaliação fisiológica das cepas será realizada utilizando o método automatizado Vitek 2 (Biomérieux, França) no qual será utilizado o cartão YST para identificação de leveduras (INFORMAÇÃO, 2008).

MALDI-TOF MS é uma tecnologia que aborda a análise proteômica microbiana. Esse método é rápido, de baixo custo, simples e aplicável para inúmeros micro-organismo, incluindo bactérias, arqueas e fungos. A capacidade dessa técnica de diferenciar a nível de espécies tem sido útil na descrição de novas espécies (LAY JR., 2001, CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

As análises com MALDI-TOF MS serão realizadas em colaboração com Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fiocruz, a partir do procedimento descrito pelo equipamento MALDI Biotyper (MALDI-TOF/MS, Bruker, Massachusetts, EUA).

- **Caracterização Genotípica**

Extração de DNA das leveduras

O primeiro procedimento para a caracterização genotípica é a extração do DNA das leveduras, para isso será utilizado o procedimento descrito por Ferrer e colaboradores (2001). A quantificação será realizada por meio do espectrofotômetro NanoDrop.

Análise de HRM

O procedimento será realizado segundo Nardi e colaboradores (2006) com adaptações. A curva de *melting* será obtida através dos seguintes passos: a aquisição de dados será realizada para cada aumento de 0, 2 °C na temperatura, com uma etapa de 10 s, com a temperatura variando de 65 a 95 °C. O equipamento utilizado será o modelo QuantStudio 7 Flex da marca Thermo Fisher Scientific.

REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 30**. Termos e definições relacionados com materiais de referência. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 35**. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2020.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 380-407, 2012.

DIFCO & BBL MANUAL. **Manual of microbiological culture media**. Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA. Disponível em: <<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9572>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6 ed. Brasília: ANVISA, 2019.

FERRER, C. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2873-79, 2001.

INFORMAÇÃO de produtos de sensibilidade. In: **VITEK 2 technology: manual do utilizador do software**. Durham: Biomérieux, Cap. 6, 2008.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)**. 1. ed. Rio de Janeiro, p. 28, 2012.

JANNING, B. et al. Development, production and certification of microbiological reference materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 240-5, 1995.

MOHD AZHAR, S.H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

LAY JR. O. MALDI – TOF Mass Spectrometry of Bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 172-94, 2001.

NADAI, C. et al. New rapid PCR protocol based on high-resolution melting analysis to identify *Saccharomyces cerevisiae* and other species within its genus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 1232-42, 2018.

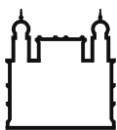
NARDI, T. et al. A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, p. 168–173, 2006.

ROSAS, C. O. et al. Microbiological reference material (bacterial and fungal domains): Definition, production rules, use and need for establishment in Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 201-8, 2019.

THE UNITED States Pharmacopoeia. 42 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess, In. KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5. ed. Ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 733-46, 2011.

APÊNDICE D - Certificado de análise do MRC *S. kudriavzevii* lote 121940001.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Certificado de Análise do Material de Referência Certificado

Microrganismo: *Saccharomyces kudriavzevii*

Número CFRVS: 40001

Origem: ATCC 2601

Lote: 121940001

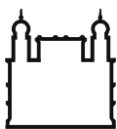
Classe de risco: Classe 1, baixo risco

Descrição: Células fúngicas em crioprotetor liofilizadas

Armazenamento: menor que -20 °C

Data de validade: até 1 ano se armazenada nas condições adequadas

Teste	Especificações	Resultado
Viabilidade	Para a determinação da UFC/μL após a reidratação, 100 μL é inoculada em meio YMA, incubada a 25 °C e após o período de incubação as colônias são contadas devendo apresentar contagem até 100 UFC/μL.	36 UFC/100 μL
Incerteza	A incerteza do MRC foi estabelecida seguindo as orientações do guia ABNT ISO GUIA 35.	4,93 UFC/100 μL
Pureza	As cepas são inoculadas em meio YMA e incubadas a 25 °C. O exame macroscópico das colônias em placa e microscópico das células devem apresentar características morfológicas e tintoriais compatíveis e com ausência de contaminantes.	Aprovado
Autenticação	É realizada caracterização morfológica (macroscópica e microscópica) e genotípica pela técnica de HRM, conforme descrito por Nadai et al., 2018.	Aprovado



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



INFORMAÇÕES DO MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO (MRC):

O MRC foi produzido no Setor de Fungos, localizado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, localizado na avenida Brasil, 4365, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, Telefone (21) 3865-5244. A produção do MRC atendeu todos os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017, além de seguir as orientações dos guias ABNT ISO GUIA 31, ABNT ISO GUIA 35 e da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

Cada frasco ampola possui 0,6 mL da levedura *S. kudriavzevii* com a adição de um agente crioprotetor que passou pelo processo de liofilização. Os frascos foram armazenados na temperatura de -20 °C.

O MRC tem seu uso pretendido para o controle de qualidade de meios de cultura, para o ensaio microbiológico do antibiótico nistatina, além de projetos de pesquisa e processos biotecnológicos.

Todos os equipamentos e vidrarias utilizados nos procedimentos de medição do MRC foram devidamente certificados e/ou qualificados, garantindo a rastreabilidade metrológica do material.

INSTRUÇÕES PARA MANUSEIO E USO:

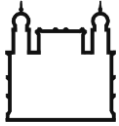
O frasco deve ser retirado da temperatura indicada para seu armazenamento e deixado na temperatura de aproximadamente (25 ± 2) °C, durante 30 min. Em seguida, o líofilo deve ser reidratado com aproximadamente 0,6 mL de água purificada, e após homogeneizado, aguardar 30 min. Após, a suspensão já hidratada deve ser novamente homogeneizada e proceder a inoculação de 100 µL, em cinco placas de Petri, contendo o meio de cultura ágar extrato de levedura-extrato de malte (YMA), a suspensão deve ser espalhada pela superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski. Por fim, a incubação deve ser realizada em estufa, na temperatura de (25 ± 2) °C, durante aproximadamente 48 h.

O prazo de validade informado nesse certificado deve ser atendido, após esse período, as informações nele contidas não serão válidas.

Documento em versão única número 001.

Curador(a) da Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS)

Data:



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



REFERÊNCIAS:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 30**. Termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 31**. Materiais de referência - Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada. Rio de Janeiro: ABNT, 2017a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA 35**. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/ISO/IEC 17034**. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2017c.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 5 ed. Amsterdam: Elsevier Science, v. 2, p. 740-741, 2011.