

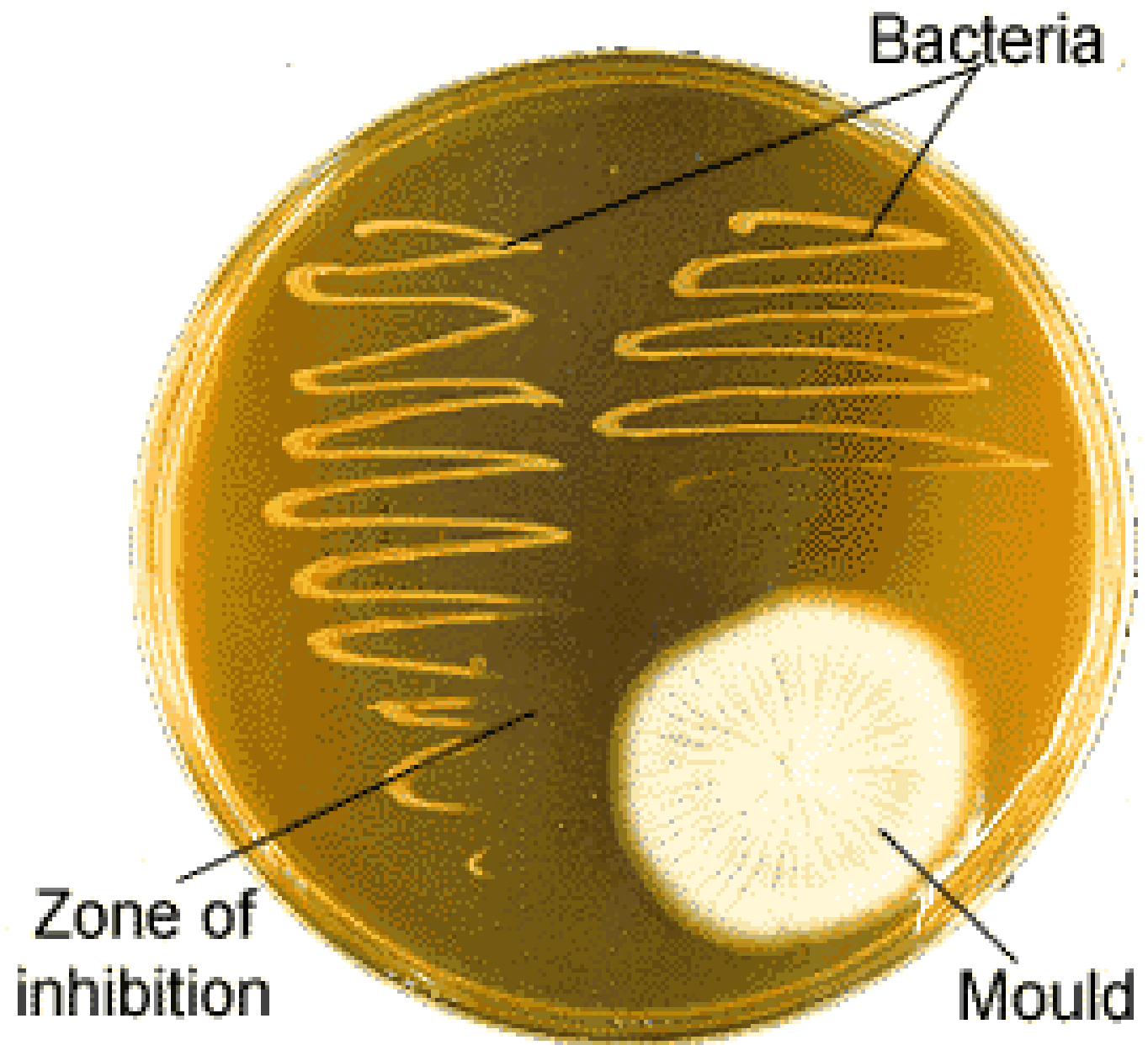


# **DROGAS ANTIMICROBIANAS**

## HISTÓRICO

- 1495: Mercúrio (SÍFILIS)
- 1630 : Quinino (MALÁRIA)
- 1905 – Paul Ehrlich → composto 606 (Salvarsan) - sífilis
- 1928: Penicillina - Alexander Fleming
- 1932: Sulfanilamida - Gerhard Domagk
- 1941: Purificação da penicilina - Ernst Chain e Howard Florey
- Pós-IIIGM: Penicilina G





# DROGAS ANTIMICROBIANAS

- Quimioterápicos ou sintéticos
- Antibióticos
- Drogas semi-sintéticas



TABLE 20.1

**Representative Sources  
of Antibiotics**

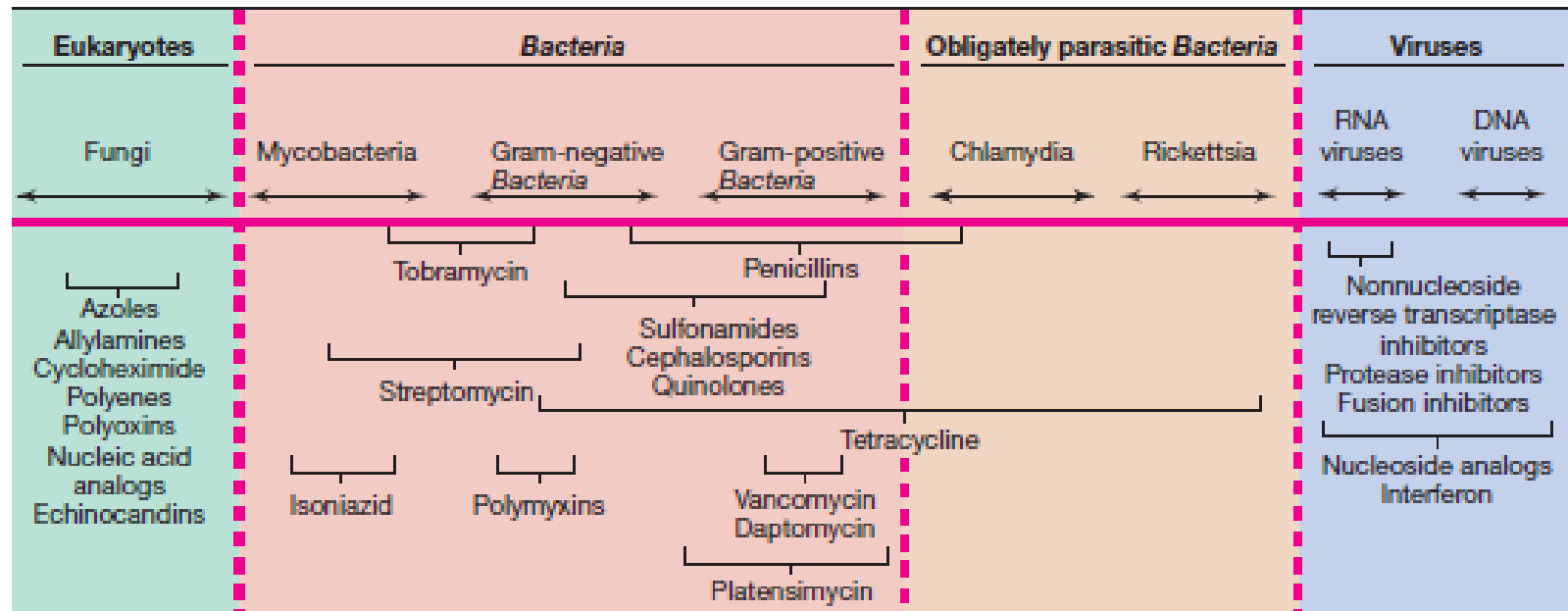
Microorganism	Antibiotic
<b>Gram-Positive Rods</b>	
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacitracin
<i>Bacillus polymyxa</i>	Polymyxin
<b>Actinomycetes</b>	
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotericin B
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Chlortetracycline and tetracycline
<i>Streptomyces erythraeus</i>	Erythromycin
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomycin
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin
<i>Micromonospora purpureae</i>	Gentamicin
<b>Fungi</b>	
<i>Cephalosporium</i> spp.	Cephalothin
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griseofulvin
<i>Penicillium notatum</i>	Penicillin

# EFEITOS

- Bacteriostático
- Bactericida



# ESPECTRO DE AÇÃO



**Figure 26.13** Antimicrobial spectrum of activity. Each antimicrobial agent affects a limited and well-defined group of microorganisms. A few agents are very specific and affect the growth of only a single genus. For example, isoniazid affects only organisms in the genus *Mycobacterium*.



# TOXICIDADE SELETIVA

- Capacidade da droga em atuar contra o patógeno alvo, sem afetar o hospedeiro.



Toxidade  
seletiva



Efeitos  
sobre o  
hospedeiro

Ex. Sulfas – alta toxicidade seletiva – atuam na via do ácido fólico em bactérias apenas.





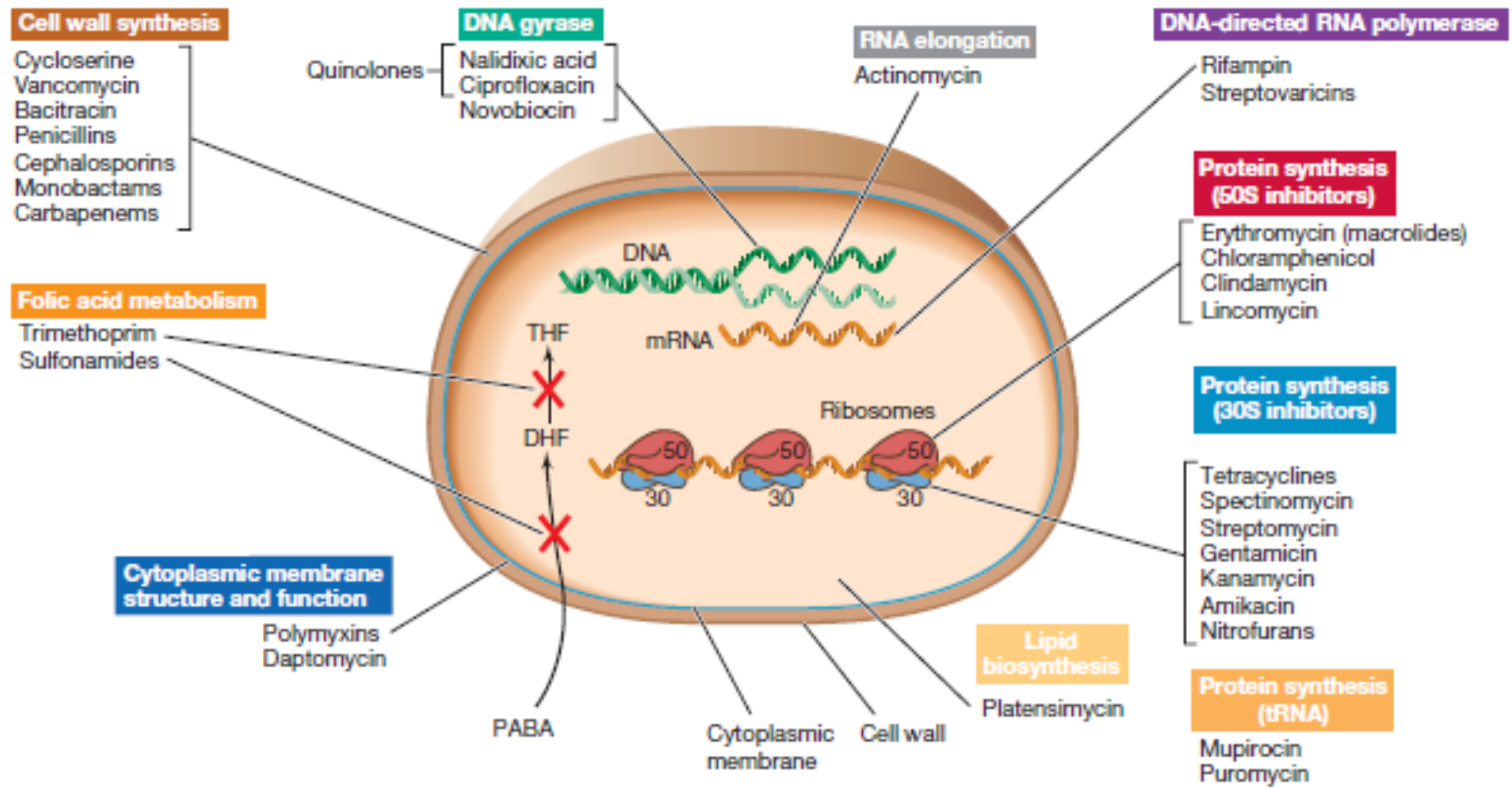


# DROGAS ANTIMICROBIANAS

# NÍVEIS DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS

- Síntese protéica (ribossomos) e transcrição
- Parede celular
- Membrana celular
- Biossíntese de lipídeos
- Vias metabólicas, DNA e RNA





**Figure 26.12** Mode of action of some major antimicrobial agents. Agents are classified according to their target structures in the bacterial cell. THF, tetrahydrofolate; DHF, dihydrofolate; mRNA, messenger RNA.





# ANTIMICROBIANOS QUE AFETAM A SÍNTESE PROTÉICA

# RIBOSSOMOS

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

## **Aminoglycosides**

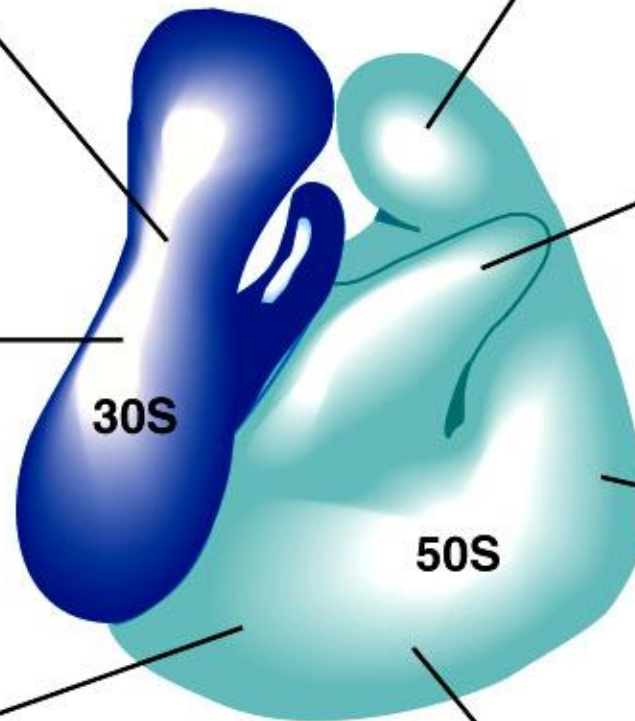
Block the initiation of translation and causes the misreading of mRNA

## **Tetracyclines**

Block the attachment of tRNA to the ribosome

## **Streptogramins**

Each interferes with a distinct step of protein synthesis



## **Macrolides**

Prevent the continuation of protein synthesis

## **Chloramphenicol**

Prevents peptide bonds from being formed

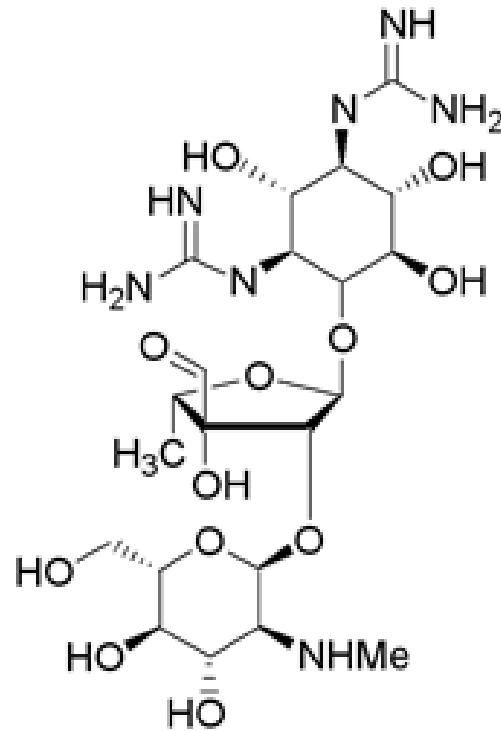
## **Lincosamides**

Prevent the continuation of protein synthesis

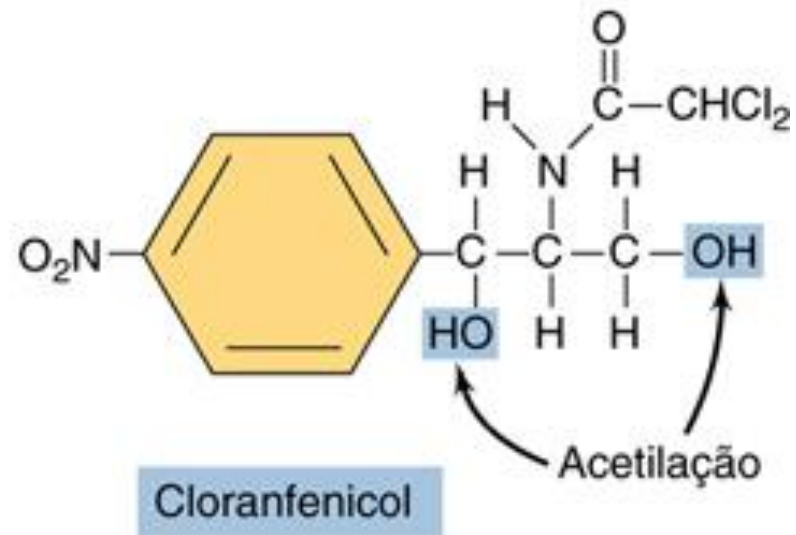
## **Oxazolidinones**

Interfere with the initiation of protein synthesis

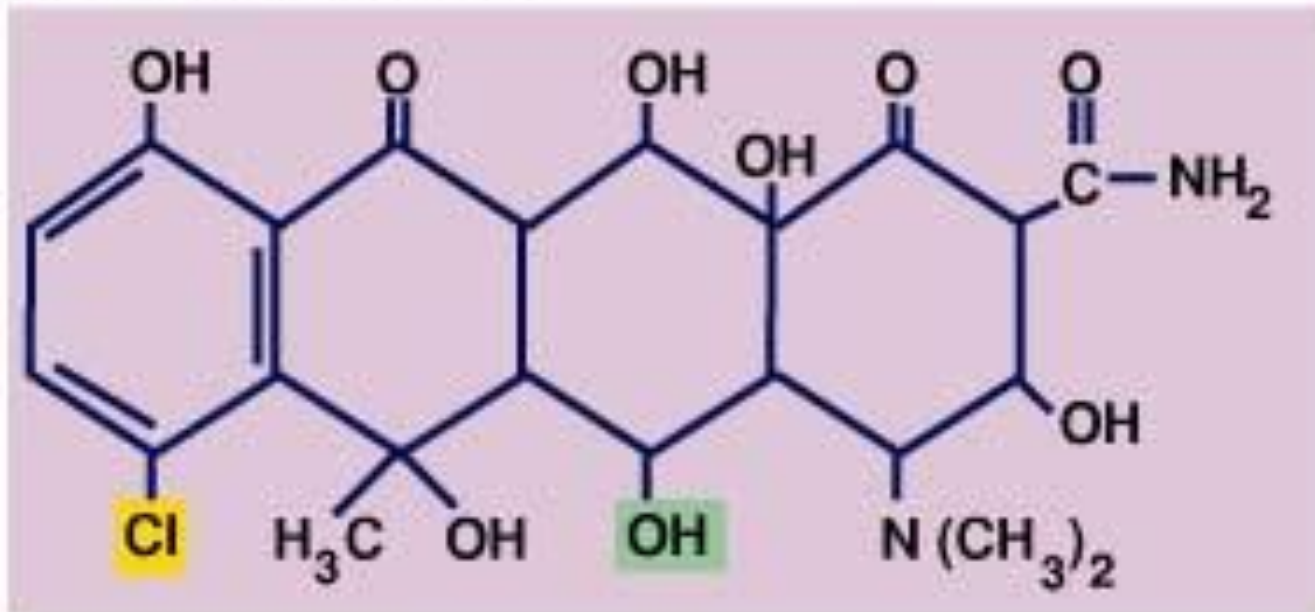
# ESTREPTOMICINA



# CLORANFENICOL



# Tetracyclines



## Tetracyclines:

Tetracycline—lacks **Cl** and **OH**

Chlortetracycline (aureomycin)—is a tetracycline with **Cl**

Doxycycline—is a tetracycline with **OH**





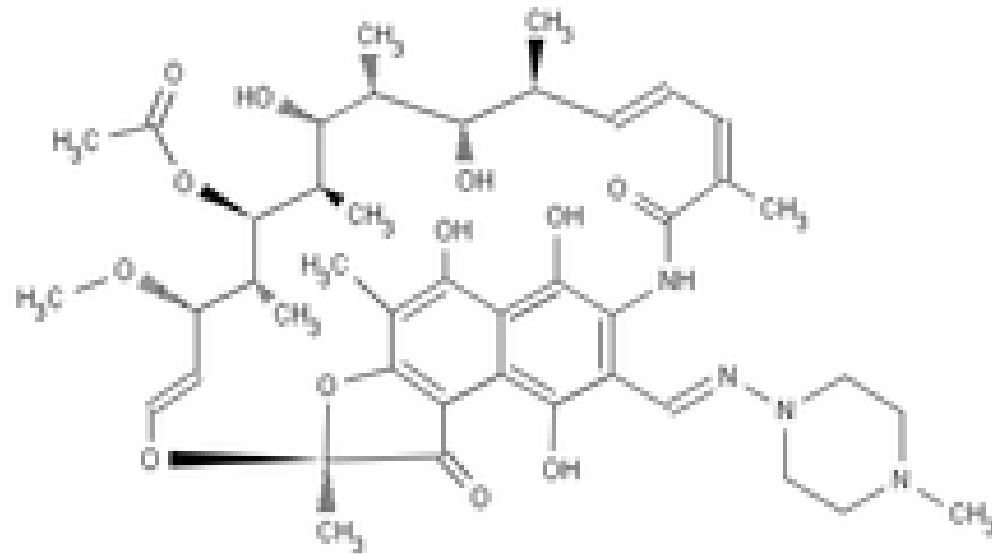
# ANTIMICROBIANOS QUE AFETAM A TRANSCRIÇÃO

# ANTIMICROBIANOS QUE AFETAM A TRANSCRIÇÃO

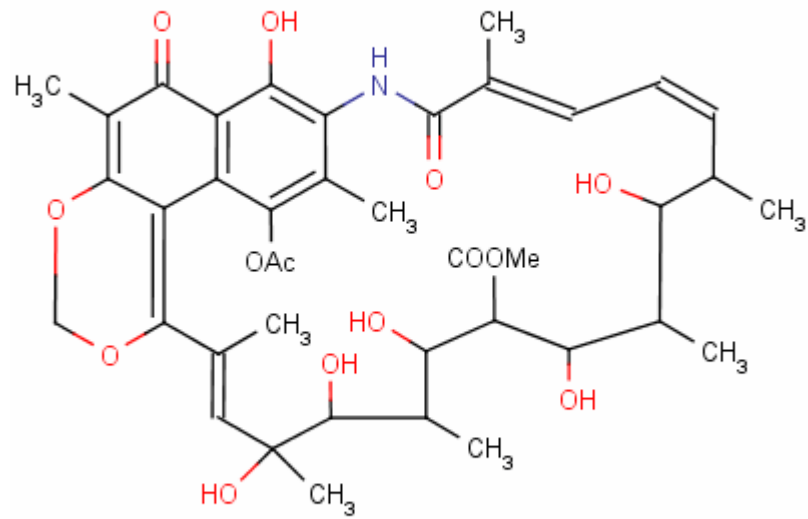
- Ligam-se à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase:
  - **Rifampicina**
  - **Estreptovaricina**
- Liga-se ao DNA e impede a síntese do RNA:
  - **Actinomicina**



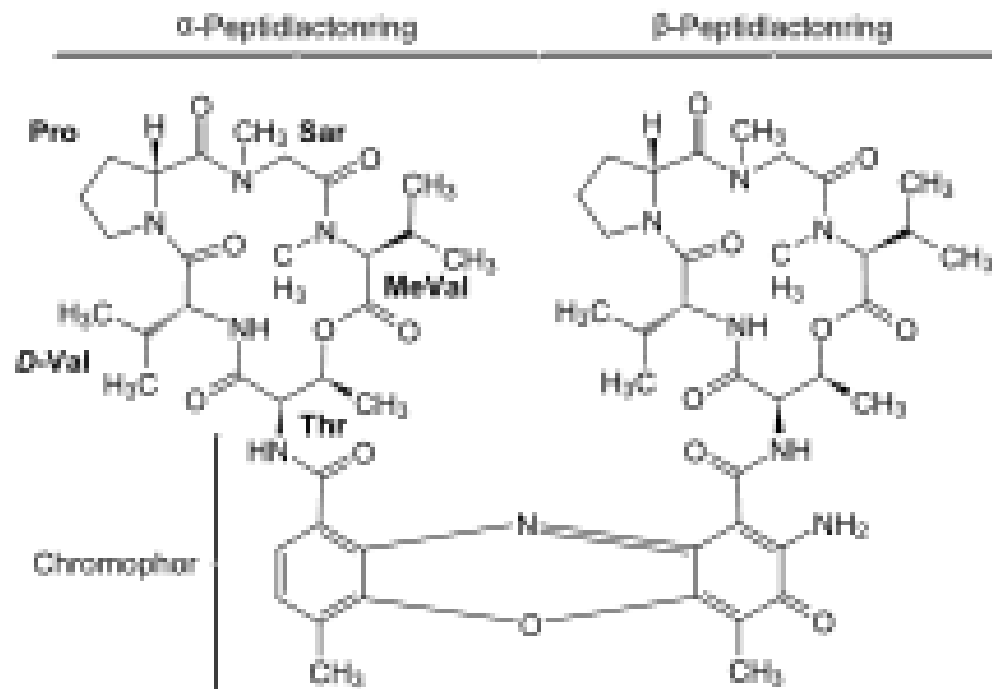
# RIFAMPICINA



# ESTREPTOVARICINA



# ACTINOMICINA





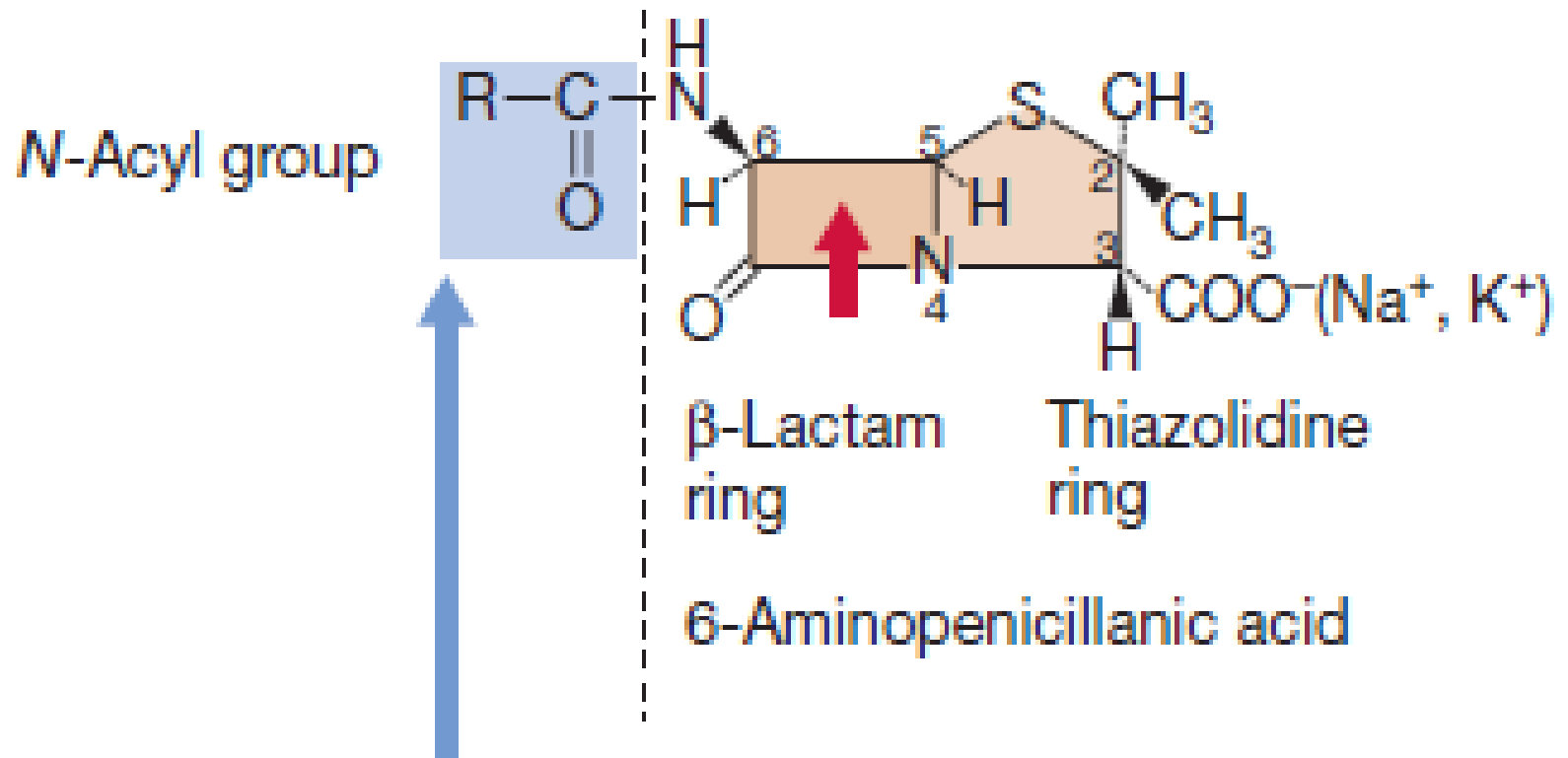
# ANTIMICROBIANOS QUE AGEM SOBRE A PAREDE CELULAR



# **B-LACTÂMICOS: PENICILINAS E CEFALOSPORINAS**

**Produzidos por eucariotos**

# B-LACTÂMICOS

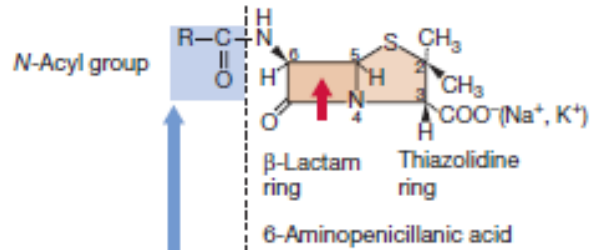




# B-LACTÂMICOS

- **Penicilinas**
- **Cefalosporinas**
- **Cefamicinas**
- $\frac{1}{2}$  de todos os antibióticos produzidos e consumidos no mundo.

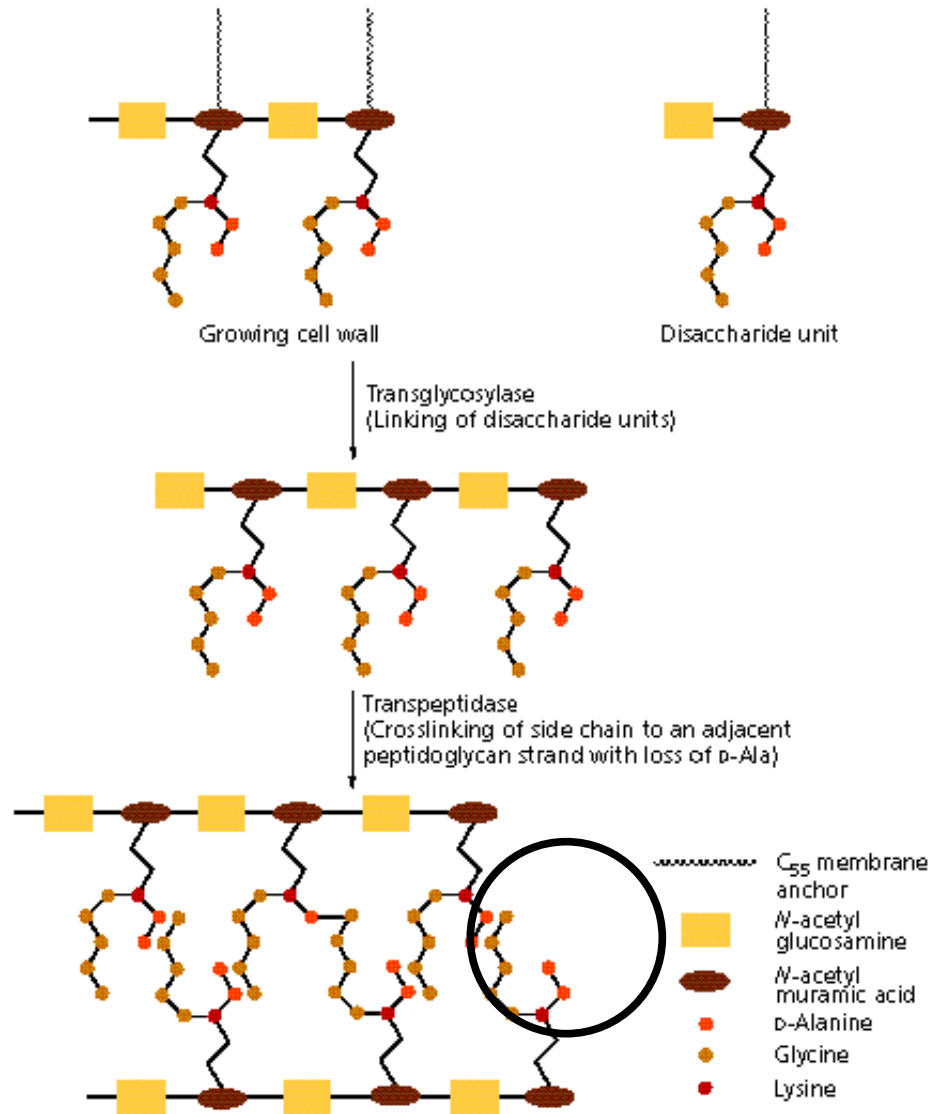


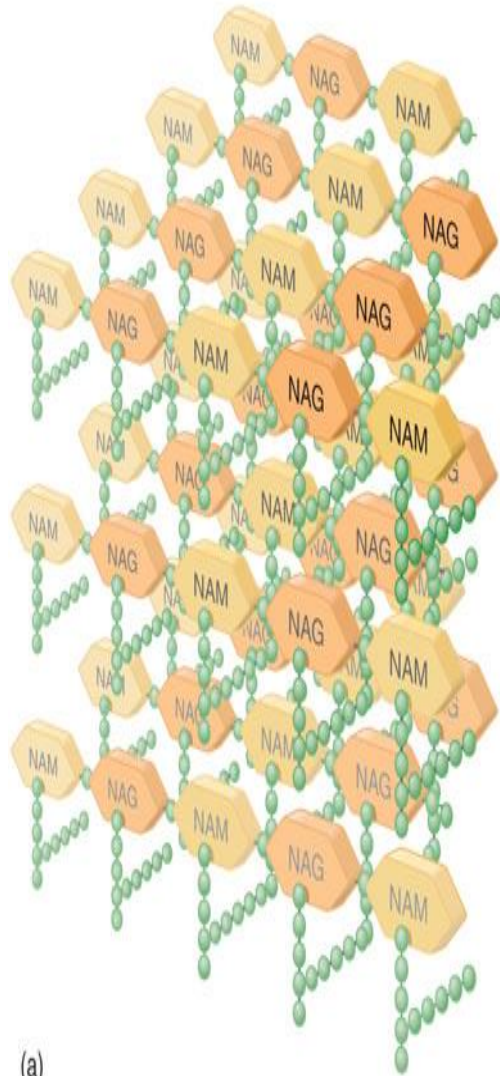


N-Acyl group	Designation
	<b>NATURAL PENICILLIN</b> Benzylpenicillin (penicillin G) Gram-positive activity $\beta$ -lactamase-sensitive
	<b>SEMISYNTHETIC PENICILLINS</b> Methicillin acid-stable, $\beta$ -lactamase-resistant
	Oxacillin acid-stable, $\beta$ -lactamase-resistant
	Ampicillin broadened spectrum of activity (especially against gram-negative Bacteria), acid-stable, $\beta$ -lactamase-sensitive
	Carbenicillin broadened spectrum of activity (especially against <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ), acid-stable but ineffective orally, $\beta$ -lactamase-sensitive

**Figure 26.19** Penicillins. The red arrow (top panel) is the site of activity of most  $\beta$ -lactamase enzymes.

# SÍNTESE DA PAREDE CELULAR



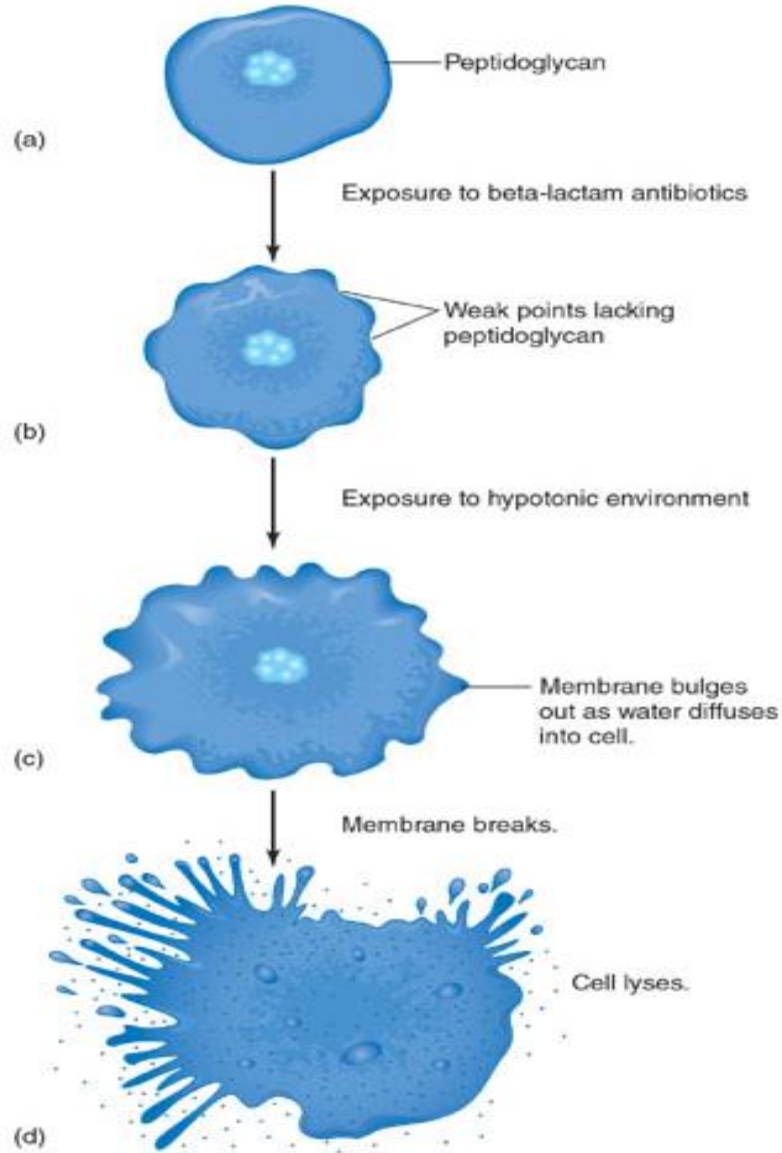


(a)



(b)





# B-LACTÂMICOS

- São altamente seletivos (alta toxicidade seletiva), pois afetam apenas as bactérias e não o hospedeiro.
- Alergias

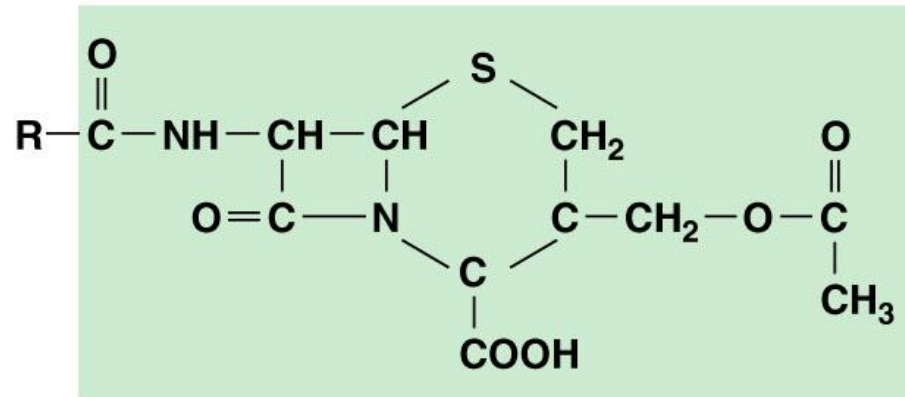


# CEFALOSPORINAS

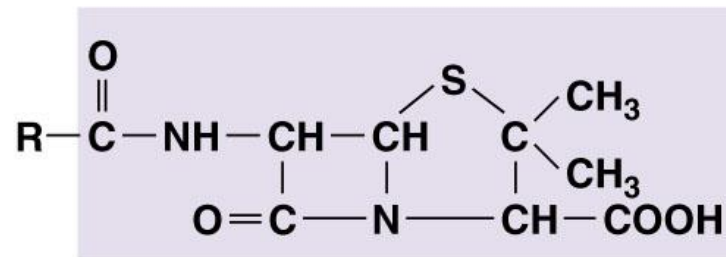
- *Cephalosporium* sp.
- **Semi-sintéticos**
- Mecanismo de ação igual ao da penicilina.
- Maior espectro de ação.
- Mais resistentes às  $\beta$ -lactamases.
- Eficiente contra *Neisseria gonorrhoeae* (resistente à penicilina).



# CEFALOSPORINAS



Cephalosporin nucleus



Penicillin nucleus



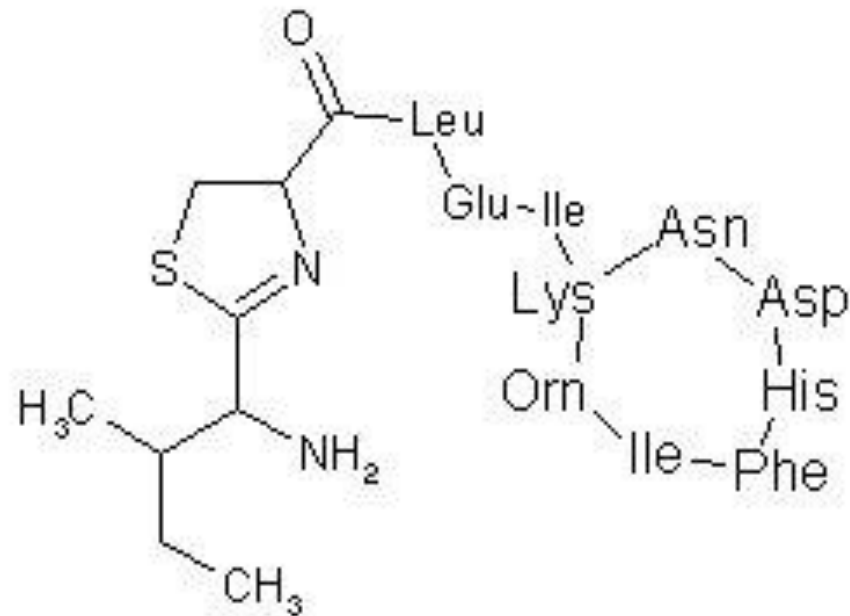


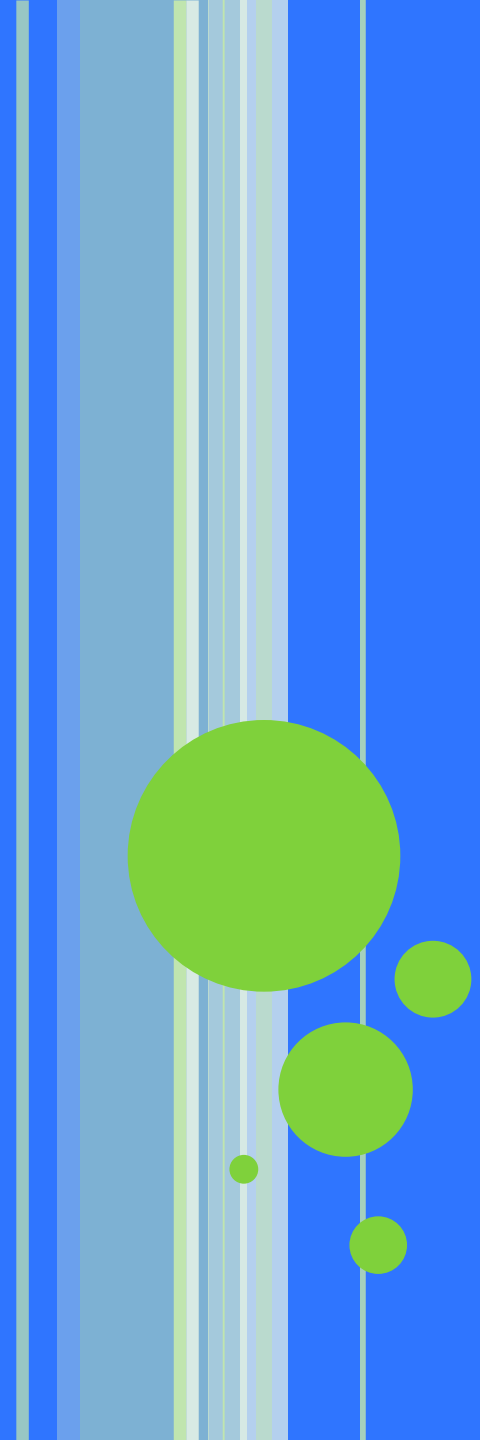
# BACITRACINA

- Produzido por *Bacillus subtilis*.
- Polipeptídeo
- Inibe a síntese da parede celular, impedindo o crescimento da cadeia de peptidoglicano.
- Uso tópico.
- Aplicado em conjunto com outras drogas.
- Composição da pomada Nebacetin (+ Neomicina)
- Efetivo contra gram-positivas e algumas gram-negativas.



# BACITRACINA



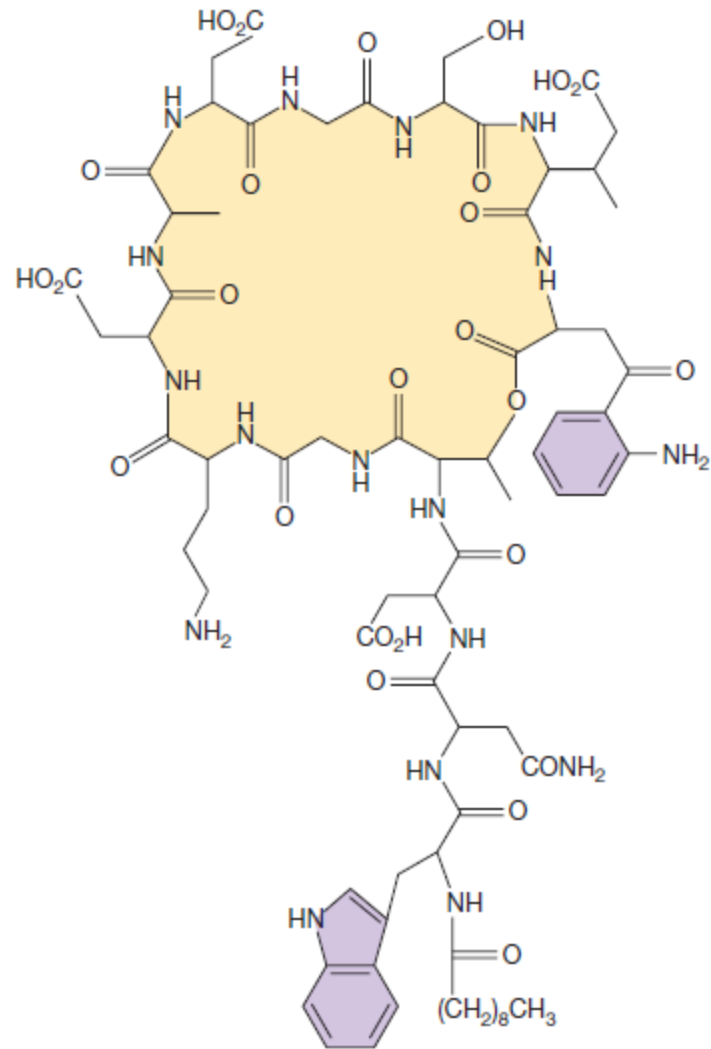


# ANTIMICROBIANOS QUE AGEM SOBRE AS MEMBRANAS CELULARES

## DAPTOMICINA\*

- Produzido por *Streptomyces* spp.
- Liga-se especificamente às membranas celulares bacterianas, formando um poro e causando sua despolarização.
- Eficiente contra gram-positivos como estafilococos e estreptococos.





**Figure 26.24 Daptomycin.** Daptomycin is a cyclic lipopeptide that depolarizes cytoplasmic membranes in gram-positive *Bacteria*.

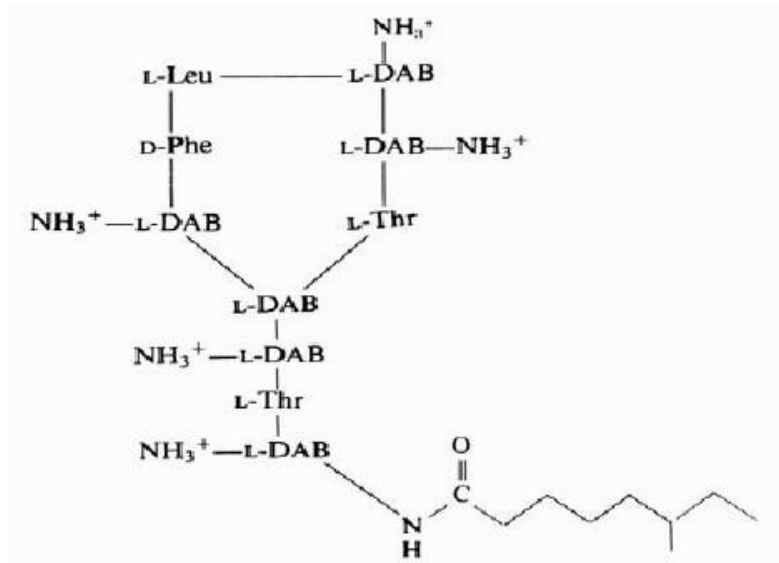


# POLIMIXINA B

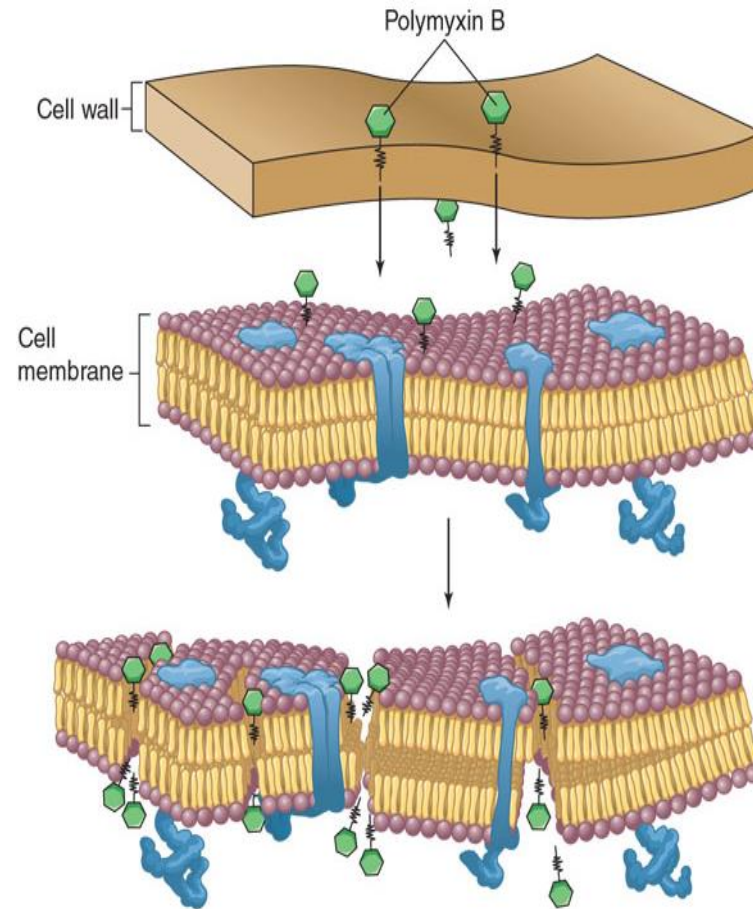
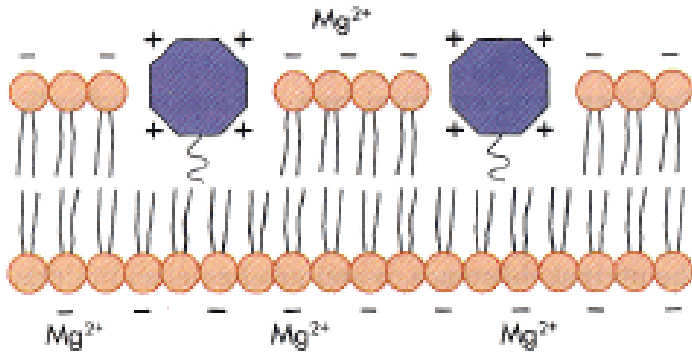
- Produzido por *Bacillus polimyxa*.
- Age na membrana celular bacteriana.
- Efetivo contra gram-negativos.



# POLIMIXINA B



# MEMBRANA CELULAR – POLIMIXINA B





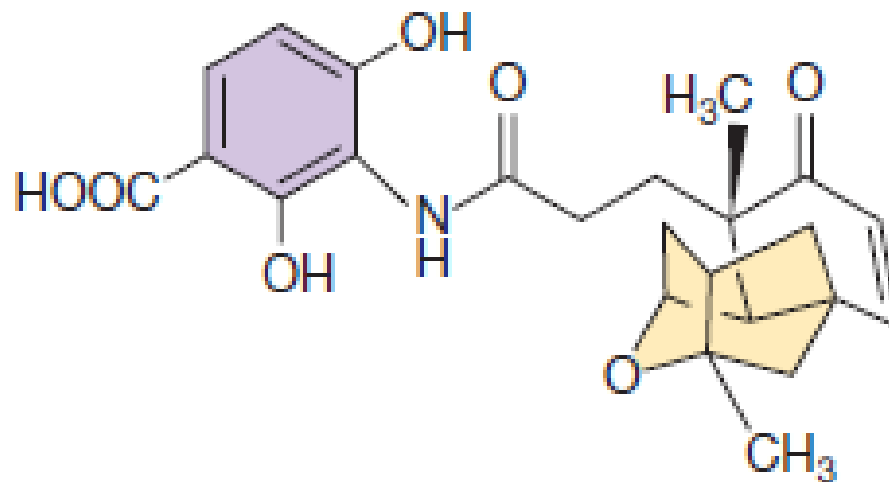


# ANTIMICROBIANOS QUE ATUAM NA BIOSSÍNTESE DE LIPÍDEOS

## PLATENSIMICINA\*

- Produzido por *Streptomyces platensis*.
- Inibe seletivamente uma enzima da biossíntese de ácidos graxos.
- É efetivo contra gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus* metilcilina resistente (MRSA) e enterococos vancomicina resistentes.





**Figure 26.25** Platensimycin. Platensimycin selectively inhibits lipid biosynthesis in *Bacteria*.





# ANTIMICROBIANOS QUE AGEM EM VIAS METABÓLICAS, DNA E RNA

# ANÁLOGOS DE FATORES DE CRESCIMENTO

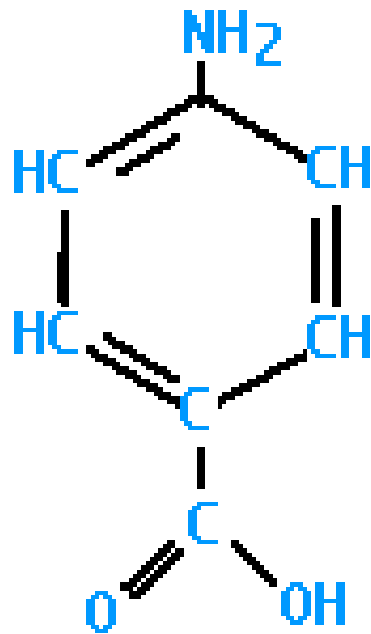
- Fatores de crescimento: aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos.
  - Sulfas
  - Isoniazida
  - Análogos de bases
  - Quinolonas



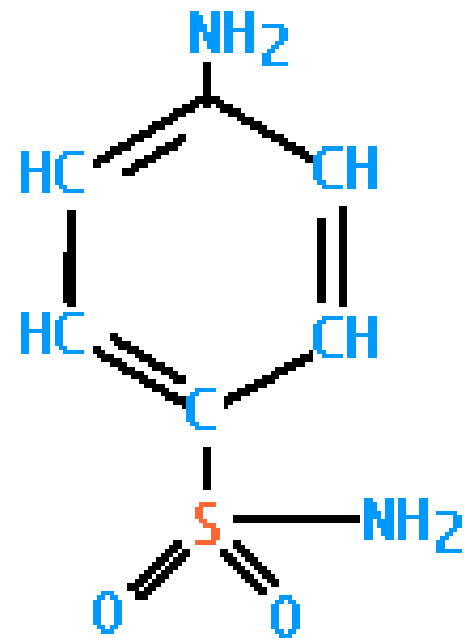
# SULFAS

- Primeira sulfa descrita foi a **Sulfanilamida**, análoga do ácido para-amino benzóico – PABA.





**Para-aminobenzoic  
Acid (PABA)**



**Sulfanilamide**

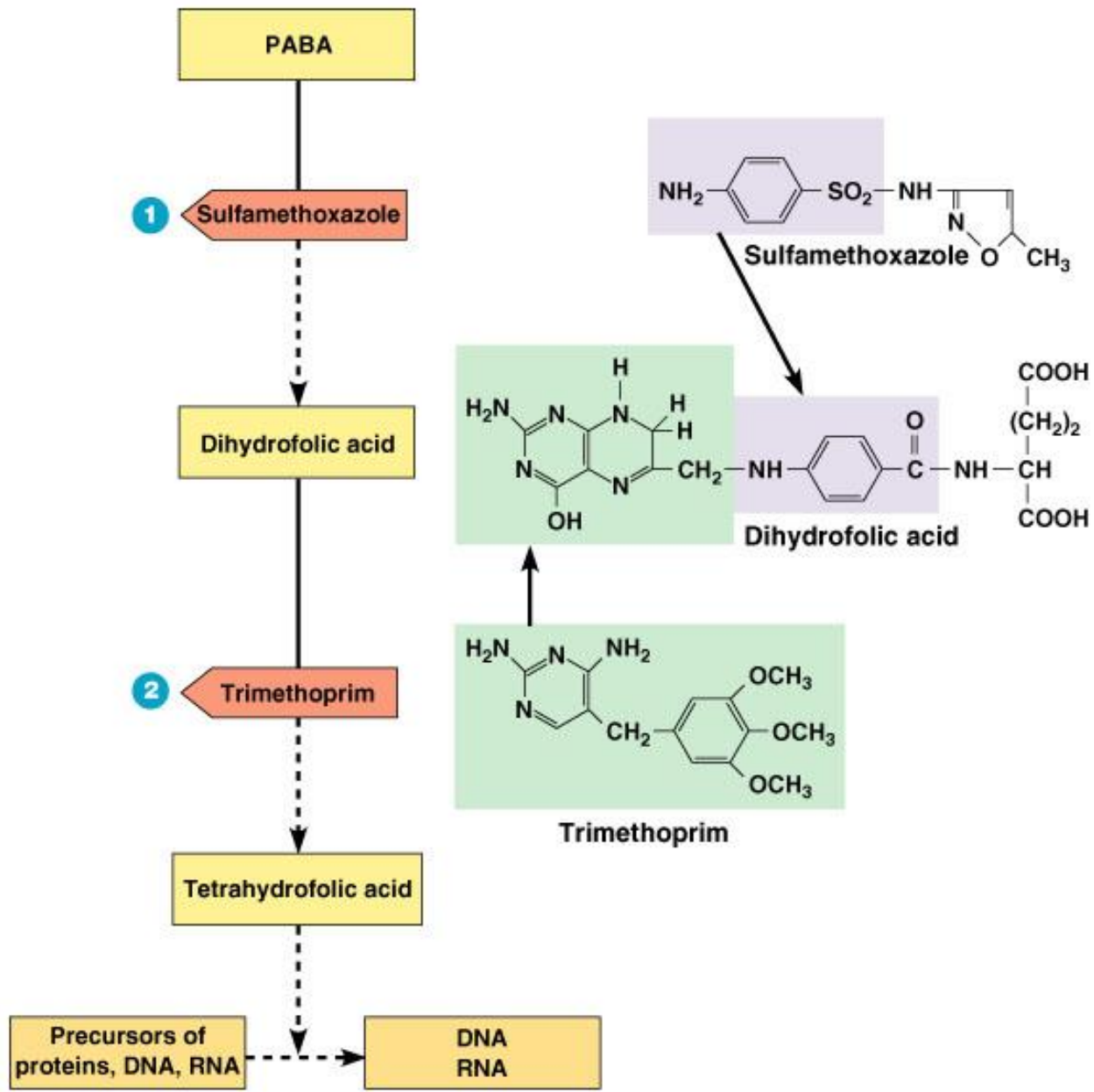


# TRIMETOPRIM

- Análogo do ácido diidrofolico.
- Usado em conjunto com as sulfonamidas.



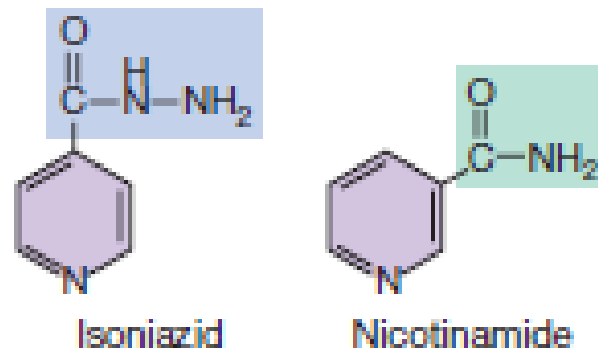




# ISONIAZIDA

- Reduzido espectro de ação – contra micobactérias.
- Interfere na síntese do ácido micólico, componente da parede celular de *Mycobacterium*.
- Droga mais eficiente no tratamento da tuberculose.





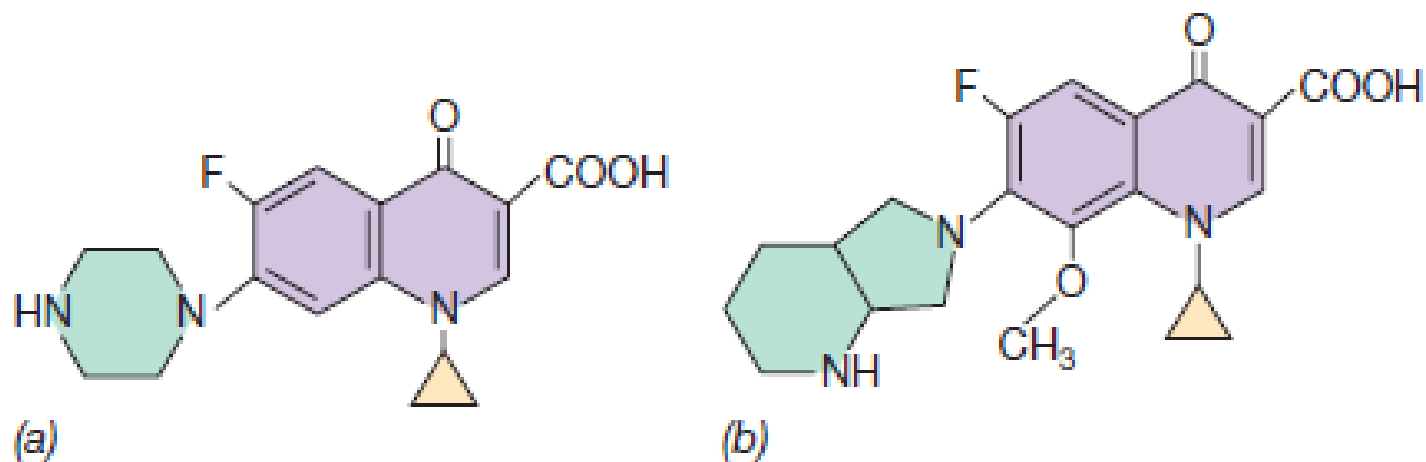
**Figure 33.11** Structure of isoniazid (isonicotinic acid hydrazide). Isoniazid is an effective chemotherapeutic agent for tuberculosis. Note the structural similarity to nicotinamide.



# QUINOLONAS

- Interferem na atividade da DNA girase, impedindo o “empacotamento” do DNA.
- Efetivas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.
- **Ciprofloxacino** – fluoroquinolona usada no tratamento de infecções urinárias.
- **Moxifloxacin\*** – droga nova, usada no tratamento de *Mycobacterium tuberculosis*.





**Figure 26.18 Quinolones.** (a) Ciprofloxacin, a fluorinated derivative of nalidixic acid with broad-spectrum activity, is more soluble than the parent compound, allowing it to reach therapeutic levels in blood and tissues. (b) Moxifloxacin, a new fluoroquinolone approved for treatment of *Mycobacterium* infections.





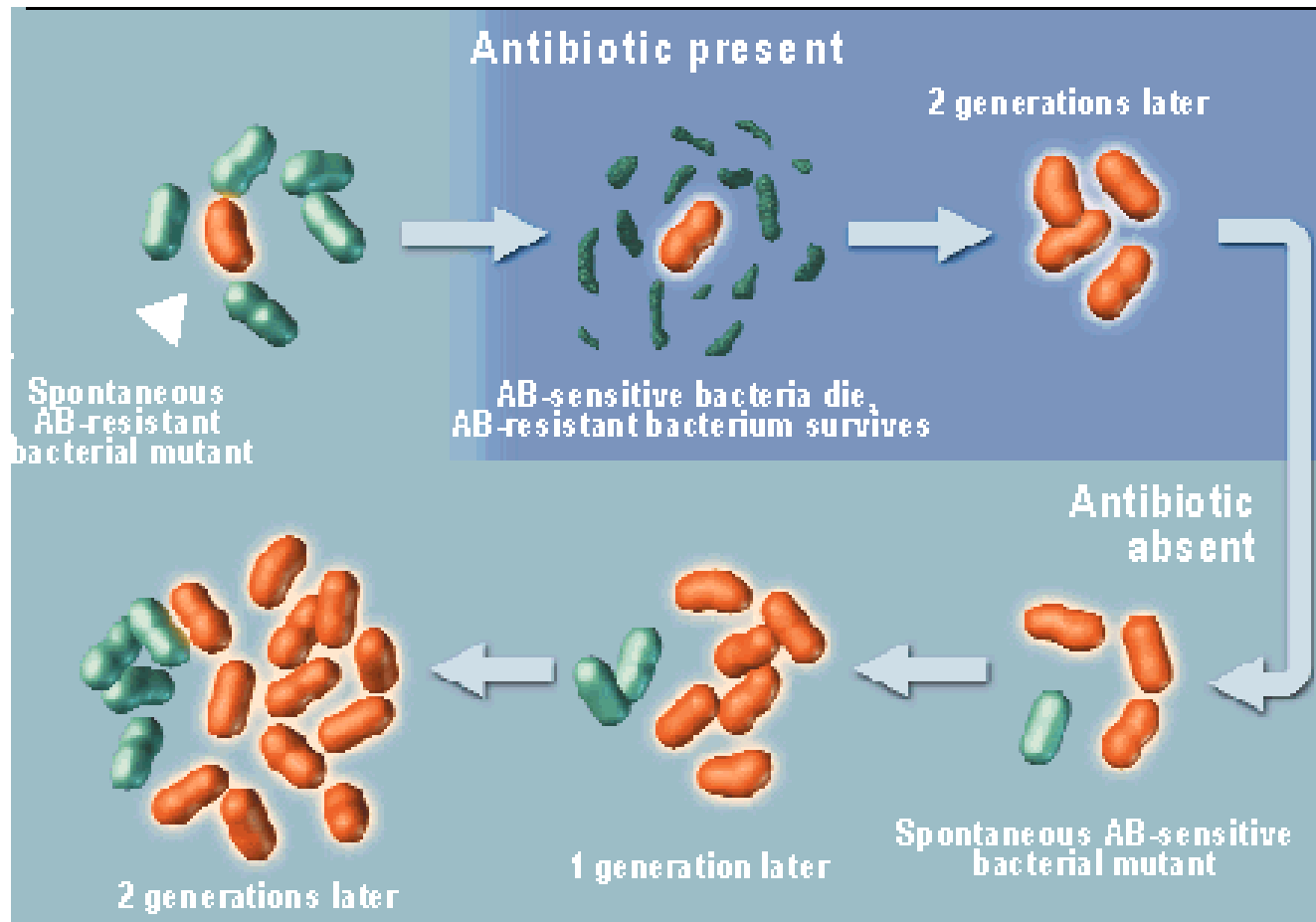
# RESISTÊNCIA BACTERIANA

# RESISTÊNCIA BACTERIANA

- Capacidade das bactérias em resistir à ação das drogas antibacterianas.



# RESISTÊNCIA BACTERIANA





# RESISTÊNCIA BACTERIANA

- Natural ou intrínseca
  - O alvo para a droga não existe na célula
    - Ex. Células sem parede celular são naturalmente resistentes à penicilina
- Adquirida
  - Mutação cromossômica
  - Plasmídeos R



# MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

- A bactéria não possui a estrutura onde o antibiótico atua.
  - Ex. Micoplasmas não têm parede celular, portanto são resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos.
- A bactéria é impermeável à droga.
  - Ex. A maioria das gram-negativas é impermeável à penicilina G e à platensimicina.
- A bactéria pode alterar a droga, inativando-a.
  - Ex. Muitos estafilococos têm  $\beta$ -lactamases, que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico.



# MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

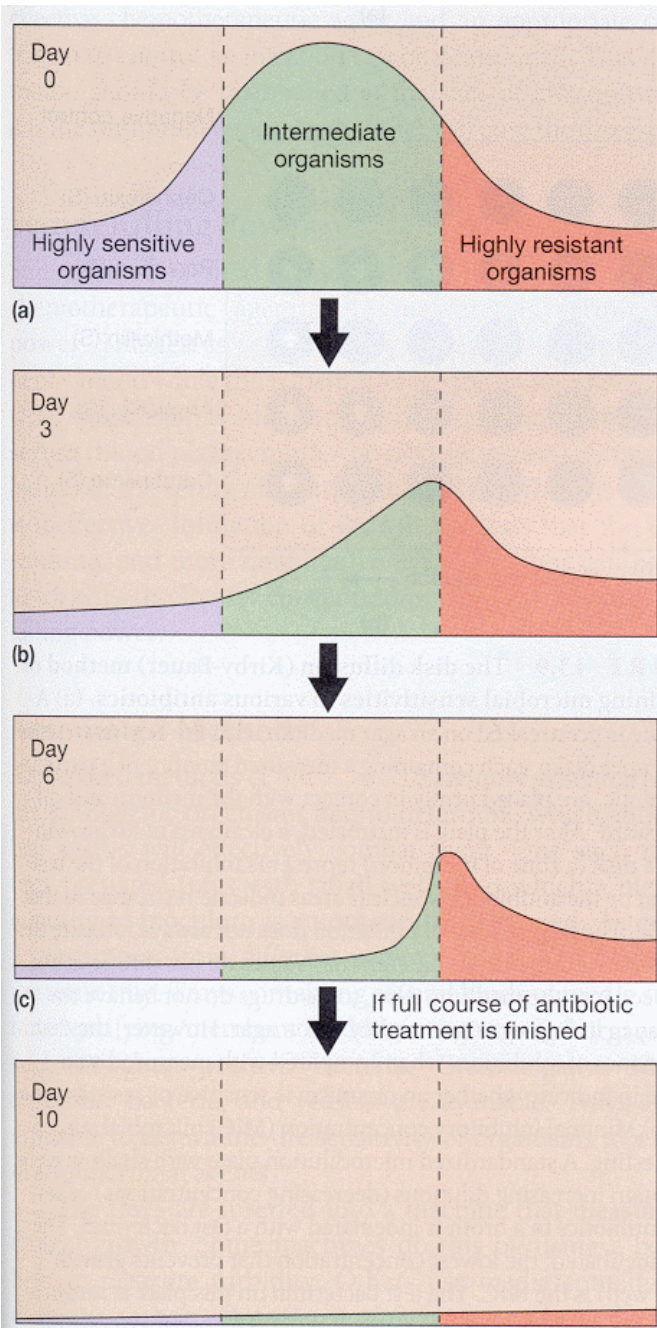
- A bactéria pode modificar o alvo da droga.
  - Ex. Modificações no ribossomo (mutações cromossômicas).
- A bactéria pode desenvolver uma via metabólica alternativa, onde a droga não atua.
  - Ex. Resistência às sulfas, que inibem a produção de ácido fólico. Estas bactérias são capazes de utilizar o ácido fólico do ambiente.
- A bactéria pode jogar a droga para fora da célula, por meio de efluxo.



# FATORES ASSOCIADOS COM A DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

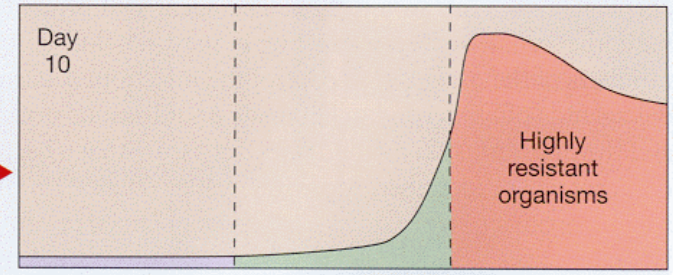
- Uso incorreto de antibióticos
  - Uso excessivo em doenças respiratórias
  - Utilização em doses e tempo incorretos
  - Uso sem prescrição médica
- Uso excessivo de alguma droga contra um determinado patógeno.
- Procedimentos de controle de infecções hospitalares falhos.
- Antibióticos usados para nutrição animal.





**FIGURE 13.8** Effects of premature termination of antibiotic treatment. (a) Organisms present before treatment begins have differing sensitivities to the antibiotic that will be used. (b) and (c) As treatment progresses, those organisms most sensitive to the antibiotic die off first, leaving mostly resistant ones as survivors. (d) Finishing the full course of treatment finally kills the most resistant organisms. (e) If antibiotics are stopped too early, the remaining resistant organisms will survive and multiply, leading to an infection that will be difficult or impossible to cure using the same antibiotic. This can then spread to other hosts.

If antibiotics are stopped prematurely



Relapse with resistant organisms

Can also spread to other hosts, causing more drug-resistant infections

## Evolution of Antimicrobial Therapy in a Nutshell

Year 2000 B.C. “Here, eat this root.”

Year A.D. 1000 “That root is heathen.

Here, say this prayer.”

Year 1850 “That prayer is superstitious.

Here, drink this potion.”

Year 1920 “That potion is snake oil.

Here, swallow this pill.”

Year 1945 “That pill is ineffective.

Here, take this penicillin.”

Year 1955 “OOPS, bugs mutated.

Here, take this tetracycline.”

Years 1960–1999 Thirty-nine more OOPS’s.

“Here, take this more powerful antibiotic.”

Year 2000 The bugs have won! “Here, eat this root.”

Anonymous observation from the *World Health  
Report on Infectious Diseases, 2000*





# TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

# ANTIBIOGRAMA

- Avaliar *in vitro* a interação fármaco-bactéria.
- Determinar a sensibilidade e a concentração mínima inibitória.
- Orientar o tratamento.





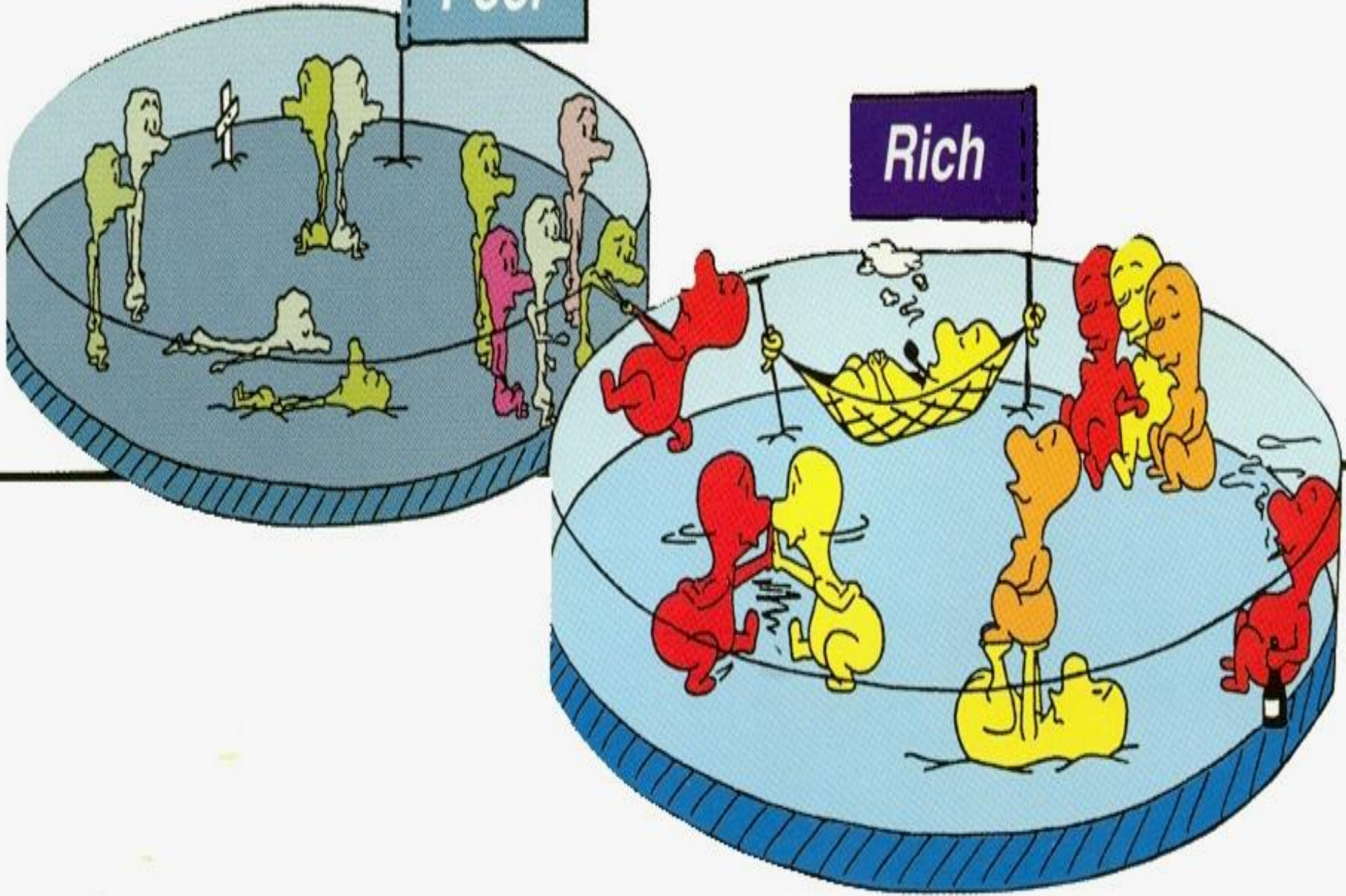
# MÉTODO DA DISCO DIFUSÃO EM ÁGAR – KIRBY-BAUER

- O antibiótico impregnado nos discos difunde-se para o meio e forma-se um halo de inibição em torno dos mesmos se as bactérias forem sensíveis à droga.
- Meio utilizado: Mueller-Hinton – baixo teor de inibidores de alguns antibióticos.



Poor

Rich



# INOCULAÇÃO

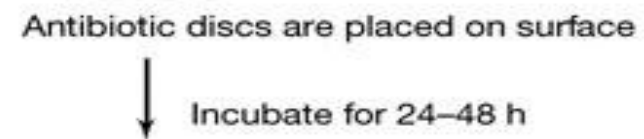
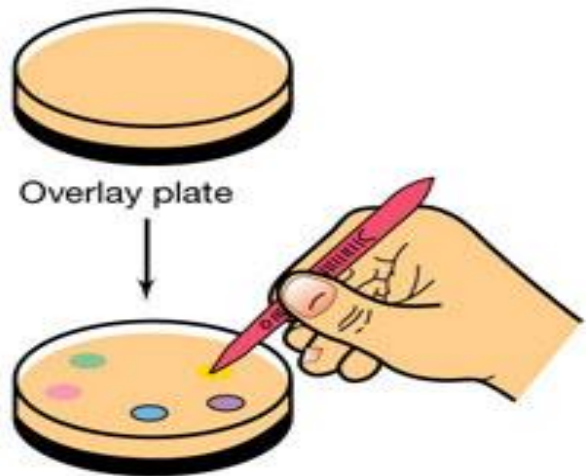
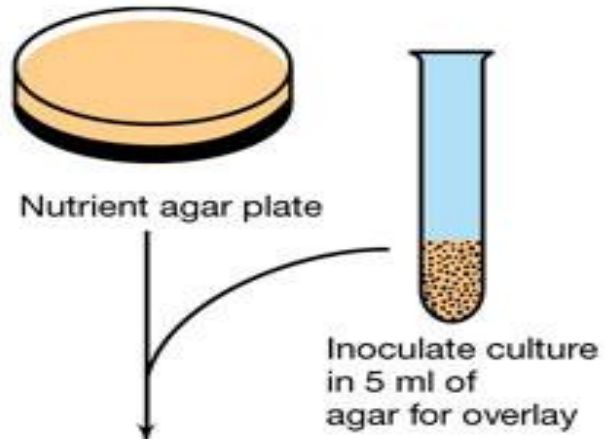


# INOCULAÇÃO



# INOCULAÇÃO

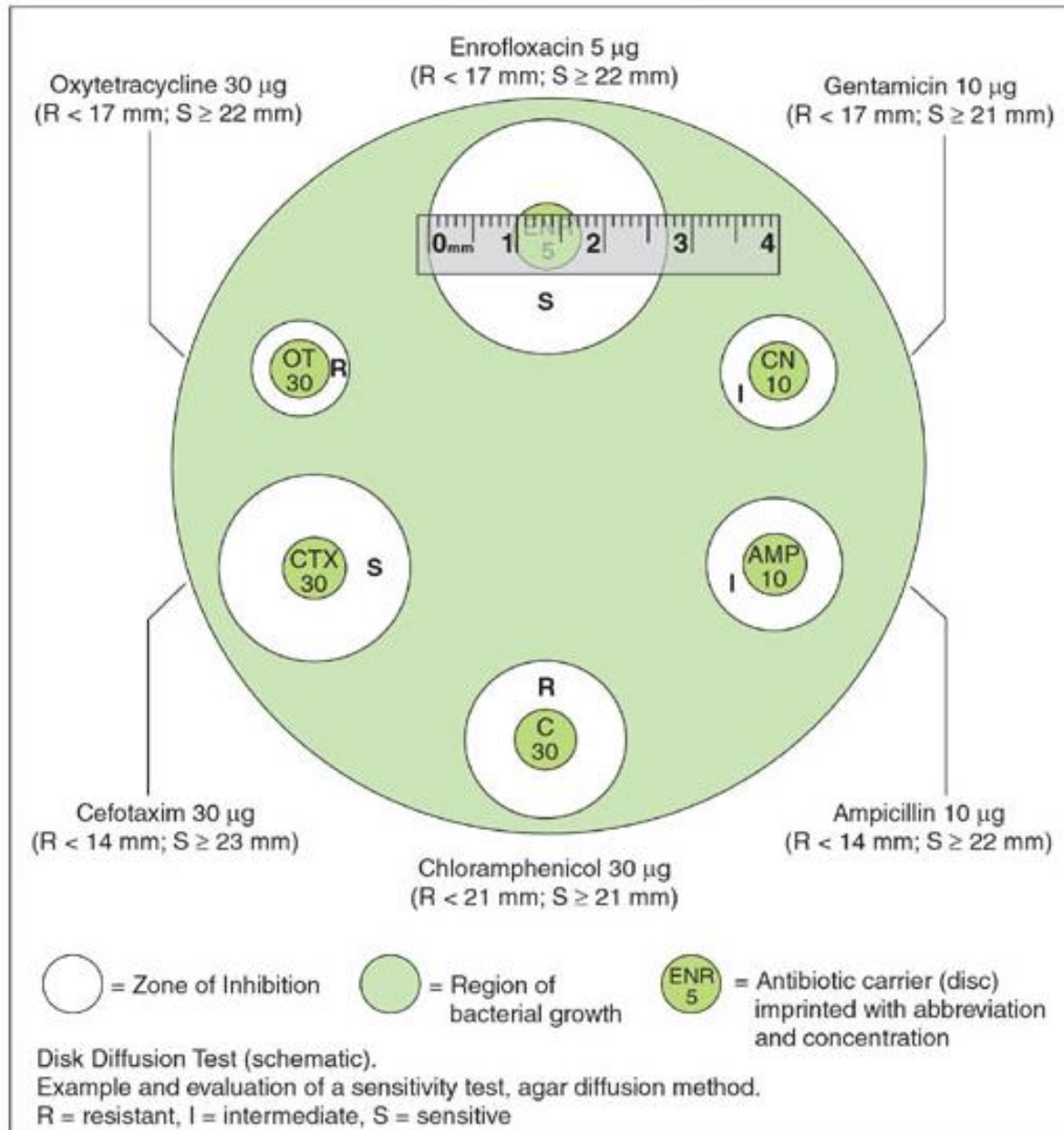




Test organism shows sensitivity to some antibiotics, indicated by inhibition of bacterial growth around discs (zones of inhibition) after incubation



## The Disk Diffusion Test

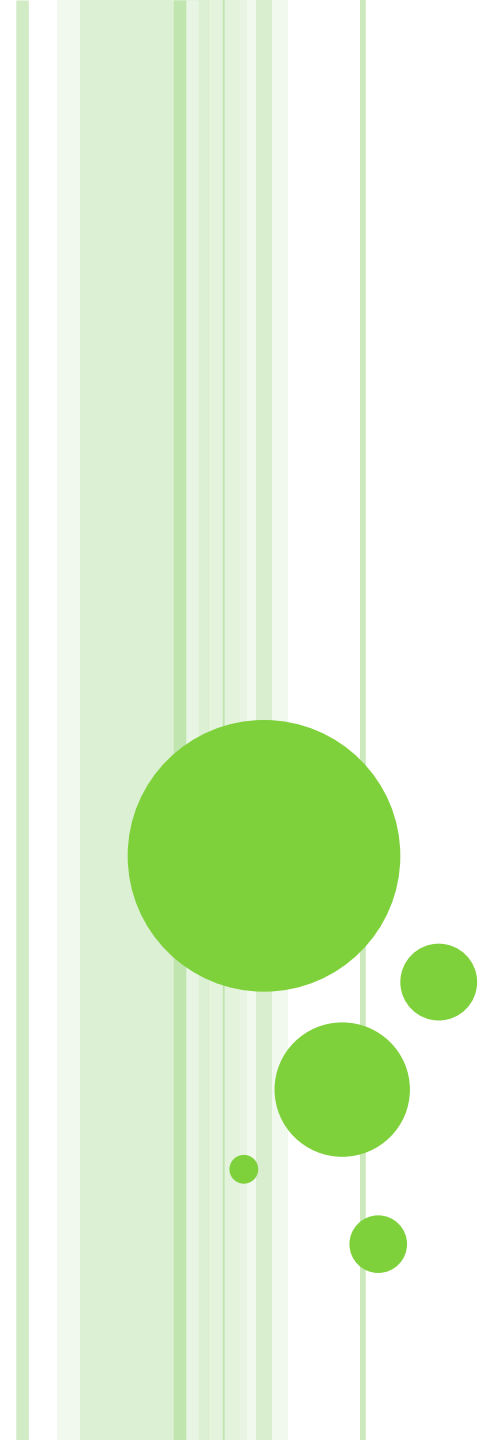






A decorative graphic on the left side of the slide. It features a vertical stack of colored bars in shades of blue and green. To the right of these bars are several green circles of varying sizes, arranged in a cluster. The text 'MICROBIOLOGIA AMBIENTAL' is positioned to the right of these circles.

# MICROBIOLOGIA AMBIENTAL



# MICROBIOLOGIA DA ÁGUA

# ÁGUA



# ÁGUA POTÁVEL

- 2,5 bilhões de pessoas não têm acesso ao saneamento básico – países em desenvolvimento.
- 1,5 milhões de crianças morrem por ano, tendo como causa as diarréias.
- OMS – 5 milhões de mortes por ano, causadas por doenças disseminadas pela água.
  - Destas, 50% são infecções intestinais.
  - Cólera é a mais frequente.



# MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS PRESENTES NA ÁGUA

- Bactérias
  - ***Salmonella* spp.**
  - ***Vibrio cholerae***
  - ***Shigella* spp.**
  - ***Yersinia enterocolitica***: gastroenterite aguda
  - ***Escherichia coli***: linhagens patogênicas: enterites
  - ***Clostridium perfringens***: enterite, gangrena gasosa
  - ***Vibrio parahaemolyticus***: gastroenterites
  - ***Pseudomonas aeruginosa***: infecções nos olhos, ouvidos
  - ***Staphylococcus aureus***: infecções cutâneas, garganta e intoxicações alimentares
  - ***Leptospira***: hepatite, conjuntivite e insuficiência renal



# MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS PRESENTES NA ÁGUA

## ○ Fungos

- aquáticos: saprófitas, parasitas de peixes
- oriundos do solo: leveduras
  - ***Candida albicans***: infecções da pele, mucosas
- fungos dermatófitos
  - ***Geotrichum***



# MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS PRESENTES NA ÁGUA

## ○ Protozoários

- ciliados
  - *Giardia lamblia*: esporos resistentes ao cloro
- amebas
  - *Entamoeba histolytica* (amebíase-doença intestinal)



# MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS PRESENTES NA ÁGUA

- Vírus
  - Hepatites A e B
  - Gastroenterite infecciosa não bacteriana
  - Poliomielite





# ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

- Visa investigar a presença de **microrganismos potencialmente patogênicos** em concentrações que comprometam o uso da água para os fins aos quais se destina:
  - Consumo humano e animal
  - Recreação
  - Navegação
  - Irrigação
  - Paisagismo



# EXAME COLIMÉTRICO DA ÁGUA

## ○ Objetivo

- Avaliar as condições sanitárias da água, investigando a presença de bactérias do grupo coliforme, que atuam como indicadores de contaminação fecal.



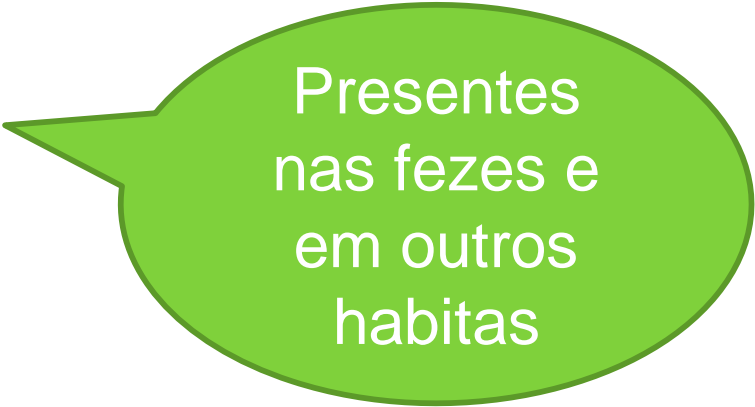
# CONTAMINAÇÃO FECAL

- Podem estar presentes nas fezes:
  - Bactérias patogênicas
    - *Pseudomonas*
    - *Enterococcus*
    - *Salmonella*
    - *Shigella*
    - *Vibrio*

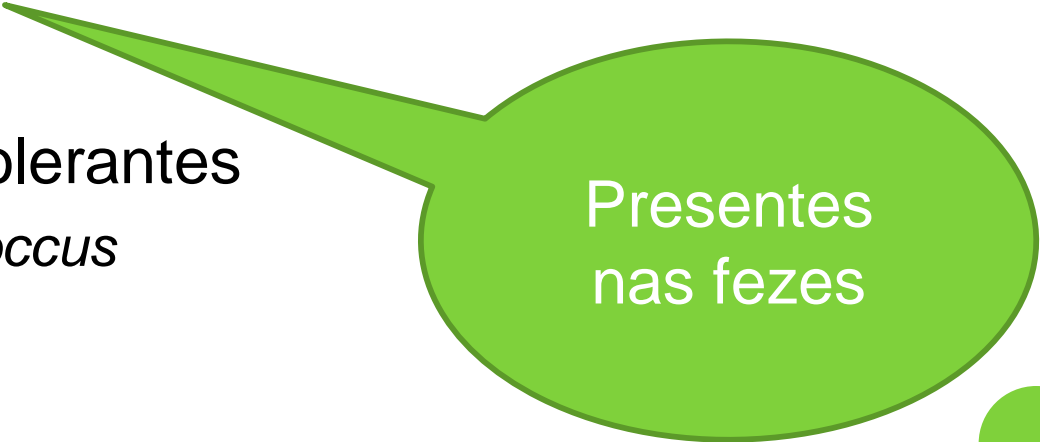


# CONTAMINAÇÃO FECAL


- Coliformes totais
  - *Escherichia coli*
  - *Enterobacter*
  - *Klebsiella*
  - *Citrobacter*
- Coliformes fecais
  - *E. coli*
- Coliformes termotolerantes
  - *E. coli* e *Enterococcus*



Presentes nas fezes e em outros habitats



Presentes nas fezes



# ORGANISMOS INDICADORES

Coliformes totais , fecais e termotolerantes são indicadores de contaminação fecal.

- ❑ Ocorrência e desaparecimento concomitante com patogênicos.
- ❑ Densidade populacional diretamente relacionada com o grau de contaminação.
- ❑ Maior sobrevivência que os patógenos.
- ❑ Ausência em água potável.
- ❑ Fácil detecção e recuperação laboratorial.
- ❑ Não prejudicial (em geral) às pessoas e animais.
- ❑ Manipulação segura.



# COLIFORMES TOTAIS

- Bacilos gram-negativos
- Aeróbios ou anaeróbios facultativos
- Não formadores de esporos
- Oxidase negativos
- Capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos
- Fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a  $35,0 \pm 0,5$  °C em 24-48 horas
- Podem apresentar atividade da B-galactosidase



## COLIFORMES FECAIS – *E. COLI*

- Fermenta lactose e manitol, com produção de ácido e gás a  $44,5 \pm 0,2$  °C em 24 horas
- Produz indol a partir do triptofano
- Oxidase negativa
- Não hidrolisa a uréia
- Atividade de B-galactosidase e B-glucoronidase
- Mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos.



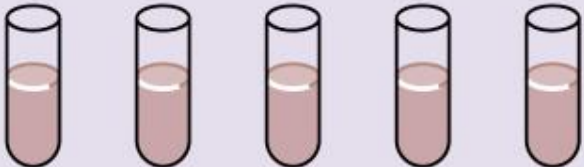


# COLIFORMES TERMOTOLERANTES

- Subgrupo dos coliformes
- Fermentam lactose a  $44,5 \pm 0,2$  °C em 24 horas
- *E. coli* é o principal representante
- *Enterococcus* – grupo dos estreptococos fecais





# MÉTODO DOS TUBOS MÚLTIPLOS

Volume of Inoculum for Each Set of Five Tubes	Tubes of Nutrient Medium (Sets of Five Tubes)	Number of Positive Tubes in Set
10 ml		5
1 ml		3
0.1 ml		1

**(a) Most probable number (MPN) dilution series**



Combination of Positives	MPN Index/ 100 ml	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

**(b) MPN table**



# PROVA PRESUNTIVA PARA COLIFORMES TOTAIS

- Meio de cultura: Caldo Lactosado
- Temperatura e tempo de incubação:
  - 35,0 +/- 0,5 °C – 24 a 48 horas



# PROVA PRESUNTIVA PARA CT

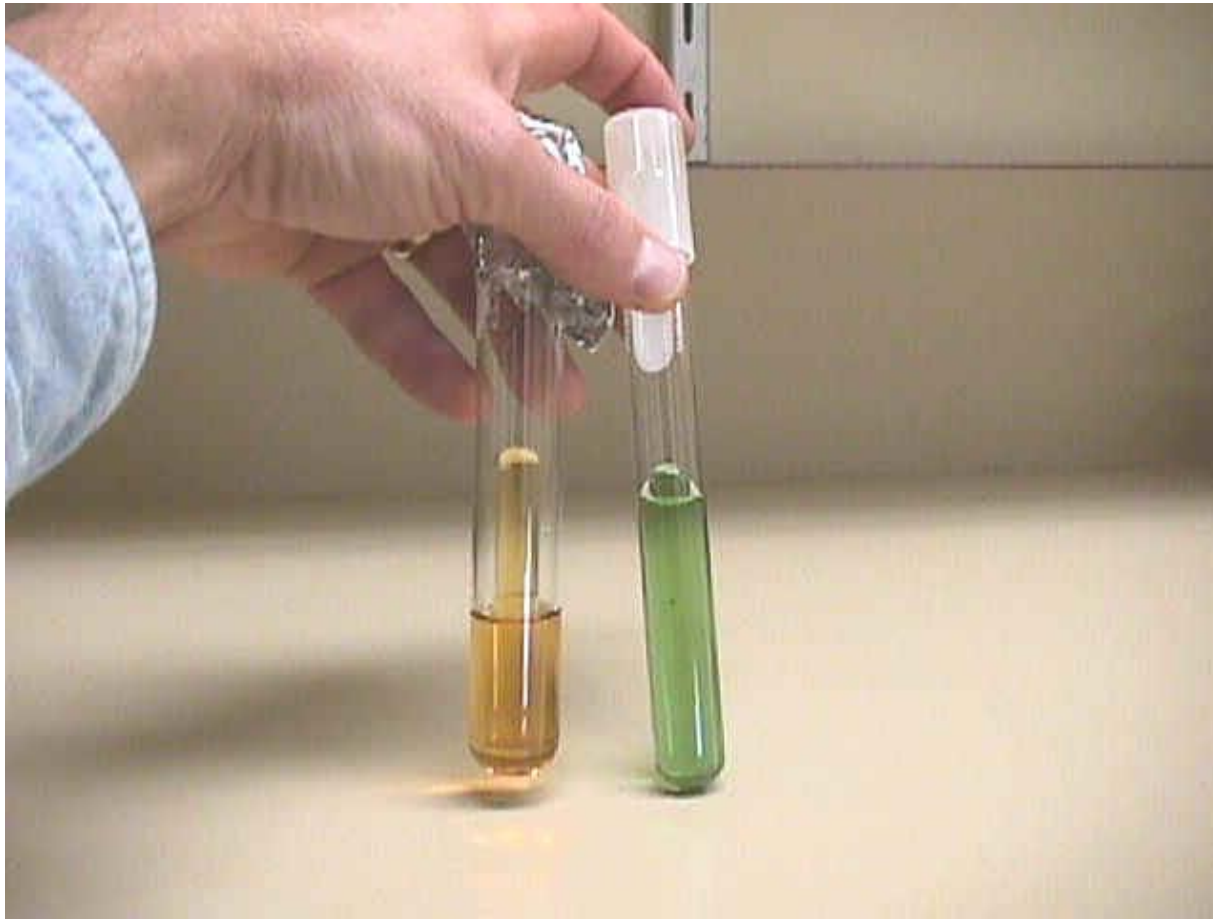


# PROVA CONFIRMATÓRIA PARA COLIFORMES TOTAIS

- Meio de cultura: Caldo Lactosado Verde Bile Brilhante
- Temperatura e tempo de incubação:
  - 35,0 +/- 0,5 °C – 24 a 48 horas



# PROVA CONFIRMATÓRIA PARA CT



# PROVA CONFIRMATÓRIA PARA COLIFORMES FECAIS

- Quantitativa
  - Meio de cultura: Caldo EC
  - Temperatura e tempo de incubação:
    - 44,5 +/- 0,2 °C – 24 horas



# PROVA CONFIRMATÓRIA PARA COLIFORMES FECAIS

## ○ Qualitativa

- Ágar Teague (EMB – eosina azul de metileno)
  - Contém lactose e sucrose (mas não glicose)
  - Azul de metileno inibe gram positivas
  - Eosina – em ph ácido torna-se escuro, com brilho verde metálico

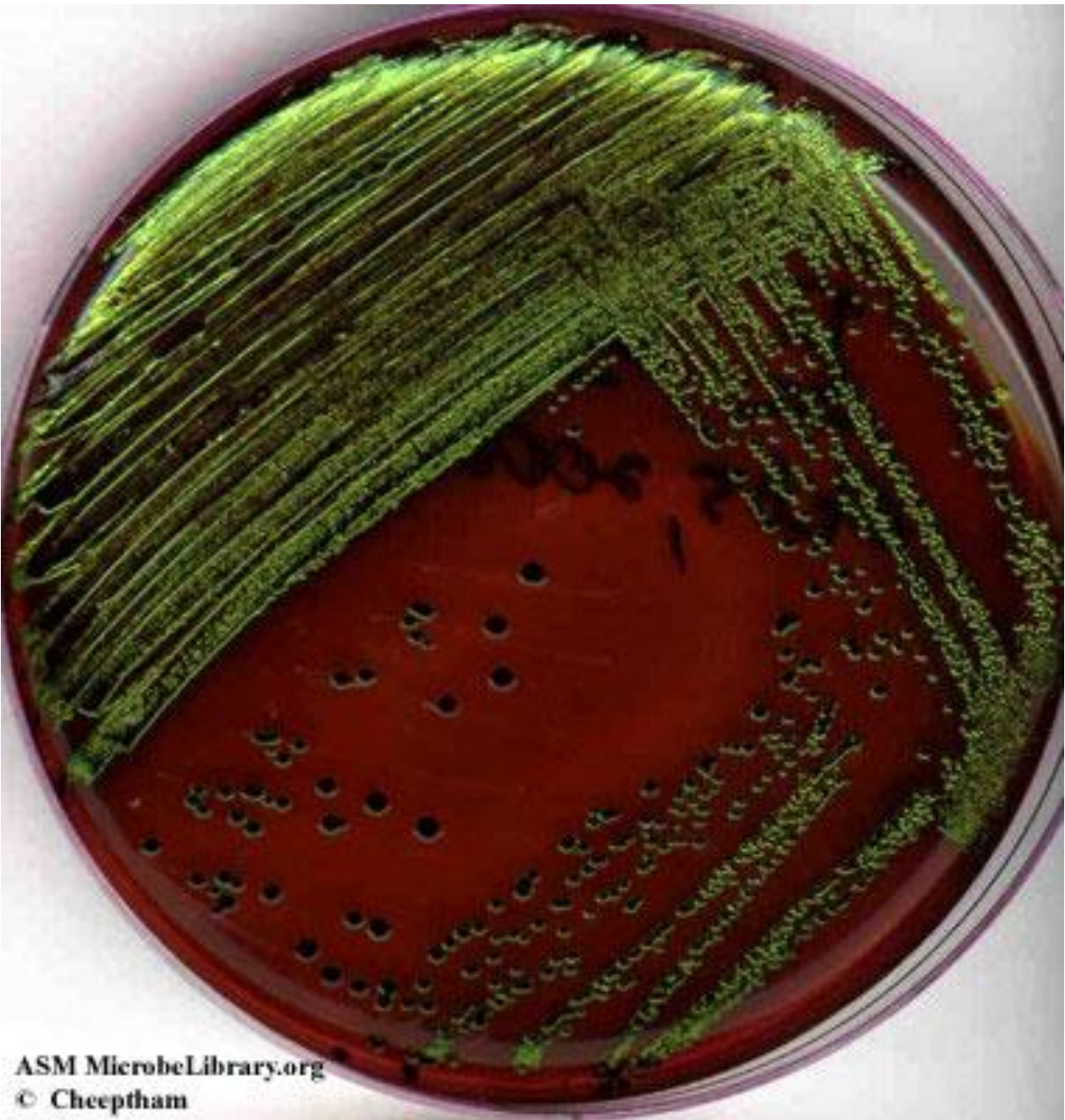


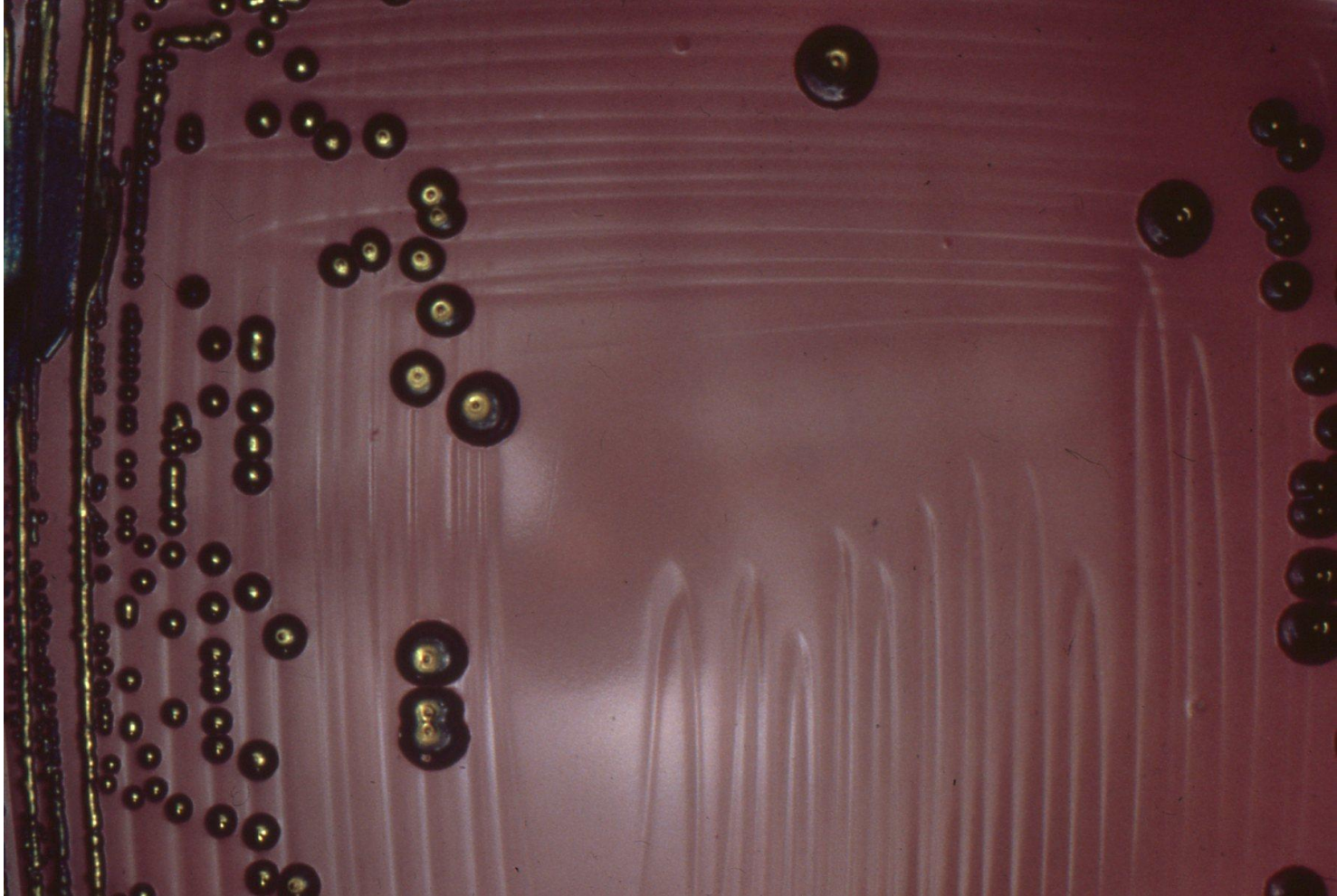


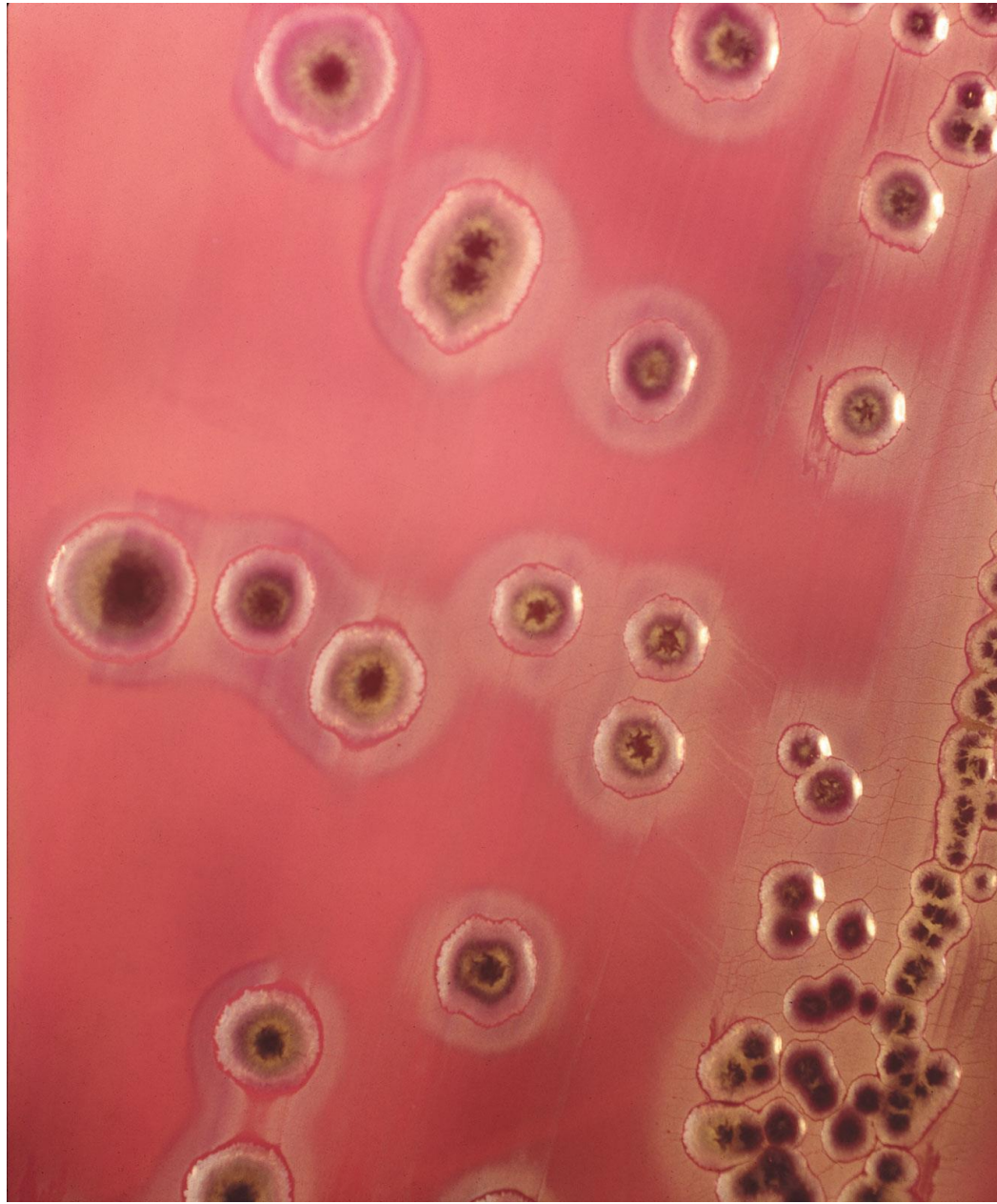
## *E. COLI* EM ÁGAR TEAGUE

- Colônias pequenas (2mm), negras, sem pigmento verde metálico difundido no meio;
- Colônias pequenas (2mm), negras com pigmento verde metálico difundido no meio;
- Colônias com centro negro e bordos róseos, com ou sem pigmento verde metálico difundido no meio.









Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Tabela de padrão microbiológico da água para consumo humano

Tipo de água		Parâmetro		VMP <sup>(1)</sup>
Água para consumo humano		<b>Escherichia coli</b> <sup>(2)</sup>		Ausência em 100 mL
Água tratada	Na saída do tratamento	Coliformes totais <sup>(3)</sup>		Ausência em 100 mL
	No sistema de distribuição (reservatórios e rede)	<b>Escherichia coli</b>		Ausência em 100 mL
		Coliformes totais <sup>(4)</sup>	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes	Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo
			Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes	Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês.

NOTAS: (1) Valor Máximo Permitido.

(2) Indicador de contaminação fecal.

(3) Indicador de eficiência de tratamento.

(4) Indicador de integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

# RESOLUÇÃO CONAMA 274/00 – CLASSIFICAÇÃO DAS ÁGUAS DOCES, SALOBRAS E SALINAS DESTINADAS À BALNEABILIDADE (RECREAÇÃO DE CONTATO PRIMÁRIO)

<b>Categoria</b>	<b>Coliformes fecais (NMP/100 mL)</b>	<b><i>Escherichia coli</i> (NMP/100 mL)</b>	<b>Enterococos (NMP/100 mL)</b>	
<b>Própria</b>	Excelente	<250 em 80% das amostras	<200 em 80% das amostras	<25 em 80% das amostras
	Boa	<500 em 80% das amostras	<400 em 80% das amostras	<50 em 80% das amostras
	Satisfatória	>1000 em mais de 20% das amostras	>800 em mais de 20% das amostras	>100 em mais de 20% das amostras
<b>Imprópria</b>	>1000 em mais de 20% das amostras	>800 em mais de 20% das amostras	>100 em mais de 20% das amostras	
	>2500 na última amostra	>2000 na última amostra	>400 na última amostra	

