



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIENCIA EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Avaliação de Formas de Preparação de Estoques de Trabalho na  
Preservação de *Streptomyces clavuligerus* visando a Produção de Ácido  
Clavulânico**

**Mestranda  
Luana Martins de Andrade**

**Orientadores  
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior - DEQ/UFSCar  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Isara Lourdes Cruz Hernández - DEQ/UFSCar**

São Carlos, Agosto 2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A553af

Andrade, Luana Martins de.

Avaliação de formas de preparação de estoques de trabalho na preservação de *Streptomyces clavuligerus* visando a produção de ácido clavulânico / Luana Martins de Andrade. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

81 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Microbiologia industrial. 2. Ácido clavulânico. 3. *Streptomyces clavuligerus*. 4. Antibióticos. 5. Biotecnologia. I. Título.

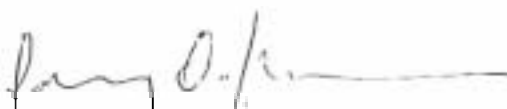
CDD: 660.62 (20<sup>a</sup>)

**LUANA MARTINS DE ANDRADE**

Dissertação de Mestrado submetida  
a Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos. çoino requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 28/08/2008**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka  
Universidade Federal de São Carlos – DEQ/UFSCar



---

Profa. Dra. Cristina Paiva de Souza  
Universidade Federal de São Carlos - DMP/UFSCar



---

Profa. Dra. Maria Lucia G. C. Araújo  
IQ - UNESP

**À Deus, meu refúgio e minha fortaleza.**

**Aos meus pais meu apoio incondicional  
em todos os momentos.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida e a capacidade de pensar e por tudo que consegui até hoje.

À minha família por todo apoio, carinho e compreensão em todos os momentos, e por sempre acreditar que eu conseguiria chegar até o fim desta etapa.

Ao professor e orientador Dr. Alberto Colli Badino Junior pela orientação científica, confiança em meu potencial, amizade, paciência e respeito demonstrado ao longo deste período.

A professora Isara Lourdes Cruz Hernández pela amizade, confiança, orientação e compreensão no decorrer deste trabalho.

Aos professores Carlos Osamu Hokka, Maria Lúcia G.da C. Araújo e Cristina Paiva de Sousa, por fazerem parte da banca examinadora, contribuindo com o desenvolvimento deste trabalho.

A PPGBiotec pela oportunidade de ingressar na pós-graduação em especial ao professor Fernando Araújo, pela amizade conquistada.

Ao Dr. Álvaro Baptista Neto pela amizade, colaboração científica, pelas dicas importantes e disponibilidade em ajudar.

Ao técnico Amadeus que esteve sempre disposto a ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica Eliton, Douglas, Clóvis, Luis Henrique, Juliana, Carol e Liliane por toda ajuda e amizade.

A todos os amigos do DEQ-UFSCar Edson, Adriano, Aline, André, Dasciana, Adilson, Mônica, Débora, Ana Maria pela amizade e pelos momentos agradáveis e inesquecíveis que passamos juntos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pelo financiamento da pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos.....	4
Metabólitos Secundário.....	6
Streptomyces clavuligerus.....	7
2.4 Ácido Clavulânico.....	8
2.5. Formas de Preservação e Armazenamento de <i>Streptomyces</i> .....	9
2.5.1 Agentes Crioprotetores.....	12
2.5.2. Criopreservação.....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
3.1. Microrganismo.....	19
3.2. Meios de Cultura.....	19
3.2.1. Meios de Cultura de Preparo de Criotubos.....	19
3.2.1.1. Meio de Cultura de Esporulação.....	19
3.2.1.2 Meio de Cultura para a Obtenção de Células Vegetativas.....	19
3.2.2. Meio de Cultura para Teste de Viabilidade Celular.....	20
3.2.3. Meio de Cultura de Reativação (MR).....	19

3.2.4. Meios de Cultura de Inóculo (MI) e de Produção (MP).....	19
3.3. Métodos Analíticos.....	20
3.3.1. Determinação da Concentração de Glicerol.....	20
3.3.2. Determinação da Concentração Celular.....	20
3.3.3. Determinação da Concentração do Ácido Clavulânico.....	21
3.3.4 Análise da Concentração de Células Viáveis.....	22
3.3.5 Acompanhamento da Morfologia Celular.....	23
3.4. Metodologia de Preparo de Criotubos.....	24
3.4.1. Criotubos de esporos.....	24
3.4.2. Criotubos de de Células Vegetativas.....	26
3.5 Metodologia de Avaliação das Formas de Preservação de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
4.1. Influência da etapa de crescimento na preservação.....	53
4.2. Influência da concentração do agente crioprotetor (glicerol 10 ou 20% v/v).....	60
4.3 Influência da Lavagem das Células.....	63
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Fórmula estrutural da Penicilina.....	4
<b>Figura 2.2:</b> Subgrupos do grupo dos $\beta$ -lactâmicos.....	5
<b>Figura 2.3:</b> Fórmula estrutural do ácido Clavulânico.....	8
<b>Figura 2.4:</b> Velocidade de congelamento de 1°C/minuto de um agente crioprotetor para minimizar o dano devido o desequilíbrio osmótico da formação de cristais de gelo.....	16
<b>Figura 3.1:</b> Curva de calibração para determinação da concentração de ácido clavulânico....	22
<b>Figura 3.2:</b> Representação do procedimento utilizado para o teste da viabilidade celular .....	23
<b>Figura 3.3:</b> Classes morfológicas de <i>Streptomyces</i> , crescido em meio de cultura e suas principais características em cada classe.....	24
<b>Figura 3.4:</b> Esquema experimental para os cultivos em mesa incubadora rotativa .....	28
<b>Figura 4.1:</b> Concentração celular ao final da etapa de reativação para as diversas condições de preservação.....	44
<b>Figura 4.2</b> Concentração celular em 144 horas de cultivo obtida a partir dos parâmetros reológicos índice de consistência (K) e índice de comportamento de escoamento (n).....	45
<b>Figura 4.3:</b> Produção de ácido clavulânico após 30 dias de armazenamento.....	46
<b>Figura 4.4:</b> Produção de ácido clavulânico após 60 dias de armazenamento .....	46
<b>Figura 4.5:</b> Produção de ácido clavulânico após 90 dias de armazenamento.....	47
<b>Figura 4.6:</b> Produção de ácido clavulânico após 120 dias de armazenamento.....	47
<b>Figura 4.7:</b> Produção de ácido clavulânico após 150 dias de armazenamento.....	48
<b>Figura 4.8:</b> Produção de ácido clavulânico após 180 dias de armazenamento.....	48
<b>Figura 4.9:</b> Produção de ácido clavulânico após 210 dias de armazenamento.....	49
<b>Figura 4.10:</b> Produção de ácido clavulânico após 240 dias de armazenamento.....	49
<b>Figura 4.11:</b> Produção de ácido clavulânico após 270 dias de armazenamento.....	50

<b>Figura 4.12:</b> Produção de ácido clavulânico após 300 dias de armazenamento.....	50
<b>Figura 4.13:</b> Produção de ácido clavulânico após 330 dias de armazenamento.....	51
<b>Figura 4.14:</b> Produção de ácido clavulânico após 360 dias de armazenamento.....	51
<b>Figura 4.15:</b> Concentração de esporos no decorrer de 360 dias.....	53
<b>Figura 4.16 :</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL1-10.....	55
<b>Figura 4.17:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL2-10.....	55
<b>Figura 4.18:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL1-20.....	56
<b>Figura 4.19:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL2-20.....	57
<b>Figura 4.20:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-10.....	58
<b>Figura 4.21:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL2-10.....	58
<b>Figura 4.22:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-20.....	59
<b>Figura 4.23:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL2-20.....	60
<b>Figura 4.24:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação E-10.....	61
<b>Figura 4.25:</b> Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação E-20.....	61

<b>Figura 4.26:</b> Produções de ácido clavulânico ao longo de 360 dias obtidas para as diferentes formas de preservação.....	64
<b>Figura 4.27:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL1-10.....	65
<b>Figura 4.28:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL2-10.....	66
<b>Figura 4.29:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL2-20.....	66
<b>Figura 4.30:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-10.....	67
<b>Figura 4.31:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL2-10.....	67
<b>Figura 4.32:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-10.....	68
<b>Figura 4.33:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-20.....	68
<b>Figura 4.34:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL2-20.....	69
<b>Figura 4.35:</b> Perfis das triplicatas de produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação E-10.....	69
<b>Figura 4.36:</b> Perfis da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação E-20.....	70
<b>Figura 4.37:</b> Micélios de <i>S. clavuligerus</i> preservados na forma CNL2-20, após a etapa de reativação (aumento de 40x).....	71

<b>Figura 4.38:</b> Micélios de <i>S. clavuligerus</i> preservados na forma CNL1-20, após a etapa de reativação (aumento de 40x).....	71
<b>Figura 4.39:</b> Micélios de <i>S. clavuligerus</i> preservados na forma CL2-20, após a etapa de reativação (aumento de 10x).....	72
<b>Figura 4.40:</b> Micélios de <i>S. clavuligerus</i> preservados na forma CL2-20, após a etapa de reativação (aumento de 10x).....	72
<b>Figura 4.41:</b> Micélios de <i>S. clavuligerus</i> preservados na forma E-10, após a etapa de reativação (aumento de 20x).....	73

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 3.1:</b> Condições de preservação da linhagem <i>Streptomyces clavuligerus</i>	
ATCC 27064.....	29
<b>Quadro 4.1:</b> Resultados obtidos no 1º ensaio após 30 dias de armazenamento.....	31
<b>Quadro 4.2:</b> Resultados obtidos no 2º ensaio após 60 dias de armazenamento.....	32
<b>Quadro 4.3:</b> Resultados obtidos no 3º ensaio após 90 dias de armazenamento.....	33
<b>Quadro 4.4:</b> Resultados obtidos no 4º ensaio após 120 dias de armazenamento.....	34
<b>Quadro 4.5:</b> Resultados obtidos no 5º ensaio após 150 dias de armazenamento.....	35
<b>Quadro 4.6:</b> Resultados obtidos no 6º ensaio após 180 dias de armazenamento.....	36
<b>Quadro 4.7:</b> Resultados obtidos no 7º ensaio após 210 dias de armazenamento.....	37
<b>Quadro 4.8:</b> Resultados obtidos no 8º ensaio após 240 dias de armazenamento.....	38
<b>Quadro 4.9:</b> Resultados obtidos no 9º ensaio após 270 dias de armazenamento.....	39
<b>Quadro 4.10:</b> Resultados obtidos no 10º ensaio após 300 dias de armazenamento.....	40
<b>Quadro 4.11:</b> Resultados obtidos no 11º ensaio após 330 dias de armazenamento.....	41
<b>Quadro 4.12:</b> Resultados obtidos no 12º ensaio após 360 dias de armazenamento.....	42

<b>Quadro 4.13:</b> Resultados da viabilidade dos conjuntos de criotubos de esporos dos ensaios.....	52
<b>Quadro 4.14:</b> Perda da capacidade produtiva de AC.....	54

## RESUMO

Muitas pesquisas microbiológicas e genéticas na indústria farmacêutica são direcionadas para o desenvolvimento de estratégias eficazes na manipulação de microrganismos, visando à produção de antibióticos conhecidos. No processo de obtenção de ácido clavulânico (AC) a partir de *Streptomyces clavuligerus* faz necessário à implementação de um sistema de conservação da linhagem para manter a capacidade do microrganismo em questão. Baseado neste propósito o objetivo deste trabalho foi testar diferentes estratégias de preservação nas formas de esporos e células vegetativas de *S. clavuligerus* ATCC 27064 para garantir condições ótimas de produção de AC. Foram preparados 8 conjuntos de criotubos de células vegetativas e avaliados durante 12 meses em relação ao número de etapas de crescimento (uma ou duas etapas de 24 horas), à influência da etapa de lavagem do micélio (lavados ou não) e a concentração do agente crioprotetor (glicerol 10 ou 20% v/v). Dois conjuntos de criotubos de esporos também foram avaliados em relação à concentração do agente crioprotetor. Todos os cultivos foram realizados em mesa incubadora rotativa utilizando-se o meio de cultura ISP1 para reativação e, meio complexo para produção de AC. Avaliou-se em todos os cultivos a morfologia, o crescimento celular, e a produção de AC. Como resultados principais obteve-se que à conservação de esporos com 10% de glicerol permitiu uma viabilidade maior que a condição E-20 durante os 360 dias de armazenamento, sendo que a perda de produção de AC após 360 dias foi de 18% em comparação com a condição E-20 que foi de 50%. As formas de preservação CL1-20 e CL2-20 foram as melhores condições de preservação (mais estável) entre os criotubos preservados na forma de células vegetativas. Em relação às produções de AC obtidas, o valor máximo alcançado foi de 1300 mg.L<sup>-1</sup> em 144 h, no modo de preservação CNL 2-20.

## ABSTRACT

A great deal of microbiological and genetic research in the pharmaceutical industry is directed towards the development of effective strategies in the handling of microorganisms seeking the production of antibiotics that already known. In the process of obtaining clavulanic acid (CA) from *Streptomyces clavuligerus*, it is necessary to implement a system of strain conservation to maintain the capacity of microorganisms. Therefore, the purpose of this study was to test different preservation strategies of spores and vegetative cells of *S. clavuligerus* ATCC 27064 in order to ensure optimum conditions for the production of CA. Eight sets of vegetative cells stored in cryotubes were prepared, and they were evaluated for 12 months according to the number of growth stages (one or two 24-hour stages), the influence of the mycelium washing stage (washed or not), and the concentration of the cryoprotective agents (glycerol 10 or 20% v/v). Two sets of spores stored in cryotubes were also evaluated according to the concentration of cryoprotective agents. All cultures were performed in a rotating table incubator using the culture medium ISP1 for reactivation and complex medium for the production of CA. Morphology, cell growth, and the production of CA were evaluated in all cultures. The major findings were that the conservation of spores with 10% glycerol (E-10) allowed a more viable condition than the E-20 during the 360 days of storage, and the loss of CA production after 360 days was 18% but the condition E-20 was 50%. CL1-20 and CL2-20 were the best preservation conditions (more stable) for vegetative cells stored in cryotubes. Regarding the production of CA obtained, the maximum value was 1300 mg.L<sup>-1</sup> at 144 h in the CNL 2-20 preservation condition.



## 1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de microrganismos que inibem o crescimento de outros microrganismos, mesmo quando utilizado em baixas concentrações. Comercialmente, os antibióticos usuais são produzidos primariamente por fungos filamentosos e bactérias do grupo dos actinomicetos.

Um dos grupos de antibióticos mais importantes, histórica e clinicamente, é o grupo  $\beta$ -lactâmico. As penicilinas e a cefalosporinas são antibióticos desse grupo, produzidos industrialmente principalmente por linhagens mutantes altamente produtivas de fungos das espécies *Penicillium* e *Cephalosporium*, respectivamente. Esses antibióticos inibem a síntese do peptoglicano na formação da parede celular em células procarióticas. Como esse processo é uma reação única da bactéria, o antibiótico  $\beta$ -lactâmico tem alta especificidade e toxicidade relativamente baixa.

A eficácia antibacteriana dos antibióticos em geral vem diminuindo devido á capacidade de algumas bactérias produzirem  $\beta$ -lactamases, enzimas que cliva o anel  $\beta$ -lactâmicos desses compostos, que lhes conferem atividade antibacteriana. Esta resistência é uma inevitável conseqüência do processo seletivo pelo qual estes microrganismos estão passando. As enzimas  $\beta$ -lactamases catalisam reações de hidrólise dos anéis  $\beta$ -lactâmicos de penicilinas e cefalosporinas resultando em produtos sem atividade antibacteriana. Em 1977, Reading e Cole publicaram um trabalho sobre a descoberta de um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases, o qual foi denominado ácido clavulânico.

O ácido clavulânico (AC) é um composto  $\beta$ -lactâmico relacionado estruturalmente com as penicilinas e capaz de inativar uma ampla variedade de  $\beta$ -lactamases. É um dos 21 metabólitos secundários oriundos de cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, um dos mais importantes microrganismos do ponto de vista industrial (Neves *et al.*, 2001), A produção de AC requer condições especiais de cultivo como pH, temperatura, agitação e aeração, além de fontes de carbono, nitrogênio, potássio, fósforo, enxofre e oxigênio que corresponde entre 80 e 90% do material celular seco (Moo-Young *et al.*, 1995).

Algumas características que distinguem o ácido clavulânico de outros inibidores de enzimas  $\beta$ -lactamases obtidas de actinomicetos são a sua capacidade de ser extraído com solventes orgânicos do filtrado do caldo de cultivo a pH 2,0; sua alta estabilidade em sangue humano; seu amplo espectro de inibição de  $\beta$ -lactamases e sua baixa massa molar (Cole *et al.*, 1985).

*Streptomyces clavuligerus* é uma espécie de bactéria do grupo dos actinomicetos. Os actinomicetos formam hifas geralmente com diâmetro entre 0,5 a 1,0 $\mu$ m e são encontrados em solos que apresentam pH entre 6,5 a 8, sendo o seu crescimento desfavorável em pHs menores que 5,0. É uma bactéria gram-positiva, primariamente habitante do solo e semelhantes aos fungos. Existem várias espécies de *Streptomyces* produtoras de antibióticos, entre eles *S. jumonjinensis* e *S. katsuranomonus* que também sintetizam ácido clavulânico (Butherworth *et al.*, 1984).

A grande maioria dos processos biotecnológicos empregados na produção de compostos comerciais ou na transformação de substratos em produtos de maior valor agregado emprega linhagens microbianas. Contudo, o número de linhagens correntemente utilizadas em biotecnologia e o número de produtos microbianos são relativamente limitados. Dentre os grupos de microrganismos com grande potencial tecnológico destacam-se, entre outros, os fungos basidiomicéticos, as mixobactérias, os actinomicetos e as bactérias de ambientes extremos, com ênfase especial para as alcalofílicas e as hipertermofílicas (Bull *et al.*, 1992).

Muitas pesquisas microbiológicas e genéticas na indústria farmacêutica são direcionadas para o desenvolvimento de estratégias eficazes na manipulação de microrganismos, visando à produção de grandes quantidades de antibióticos conhecidos e também novos compostos antibióticos. Para isso vale ressaltar a importância do procedimento de preservação ou conservação do microrganismo, preparação de criotubos e composição dos meios de cultura nos processos fermentativos para se obter ótimas produções, associadas as facilidades de manipulação e baixos custos, assim como facilitar as etapas posteriores de separação e purificação do produto final, aspectos importantes a serem avaliados na engenharia dos bioprocessos.

O desenvolvimento de processos fermentativos industriais se inicia pela preservação e manipulação da linhagem produtora, uma etapa de primordial importância cuja elaboração depende de vários aspectos do processo como tipo de microrganismo e as necessidades do bioprocessos quanto à concentração e forma de crescimento celular.

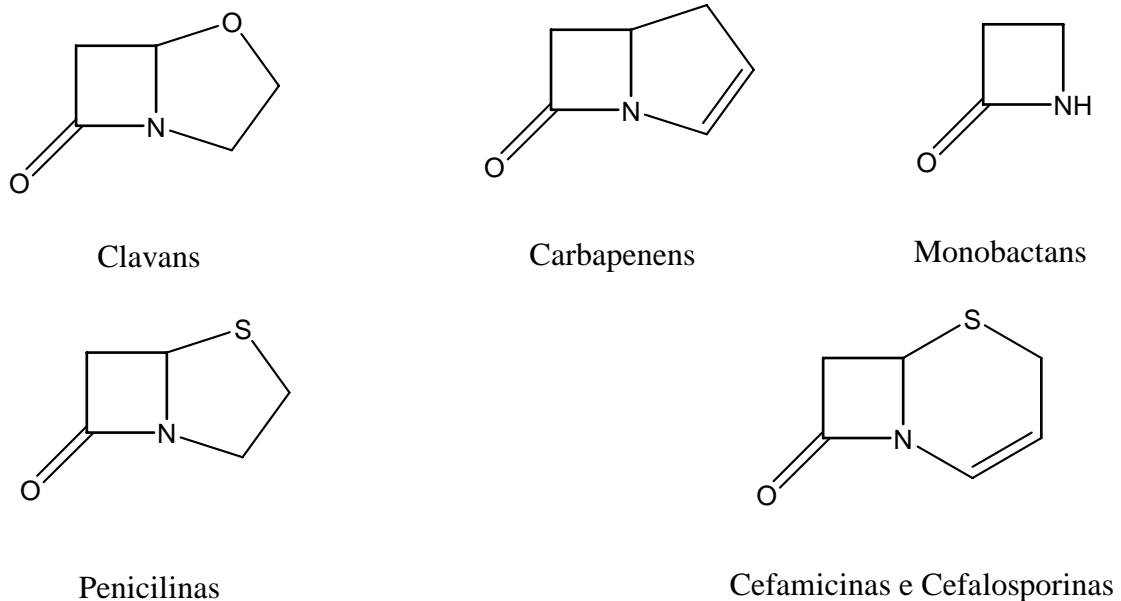
Na indústria, como também em trabalhos de pesquisa relacionados com processos fermentativos, há necessidade do desenvolvimento de um protocolo de preservação da linhagem produtora. Isto tem como objetivo aumentar o período de preservação da linhagem, mantendo propriedades biológicas como a capacidade de crescer e sintetizar o produto de interesse com pequenos desvios entre cultivos, o que assegura a estabilidade do

*Introdução*

processo de produção, com reflexos nas etapas posteriores de separação e purificação do produto.

O objetivo desse trabalho foi obter um protocolo de preparação para a preservação da linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Foram propostos diferentes formas de preservação da linhagem, sendo monitoradas as propriedades desses por um longo período de tempo (1 ano), como o crescimento e morfologia celular e, principalmente a capacidade de produção de ácido clavulânico, na busca de condições ótimas de manutenção do microrganismo.





**Figura 2.2 : Subgrupos do grupo dos  $\beta$ -lactâmico**

A resistência é uma inevitável consequência imposta pelo processo seletivo e pelo freqüente uso indiscriminado de antibióticos. Esta resistência aos antibióticos prejudica os efeitos clínicos e financeiros das terapias empregadas, pelas altas taxas de morbidez e mortalidade, longas durações nas hospitalizações, aumento nos custos com seguros de saúde, administração de drogas alternativas caras e/ou tóxicas (Essack *et al.*, 2001).

Para explicar a resistência de bactéria à ação de antibióticos, Baggaley *et al.* (1997), realizaram estudos sobre as bactérias resistentes as penicilinas e concluíram que essas são capazes de produzir enzimas que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico desse composto. Estas enzimas são conhecidas como  $\beta$ -lactamases.

Existem várias maneiras de se evitar a ação destrutiva das enzimas  $\beta$ -lactamases: alterando a estrutura dos compostos  $\beta$ -lactâmicos, fazendo com que estes fiquem insensíveis a hidrólise pelas  $\beta$ -lactamases e mantendo seu potencial antibiótico (Hakimelahi *et al.*, 2002) ou utilizando um reagente que incapacite a ação da enzima  $\beta$ -lactamase, em conjunto com um antibiótico  $\beta$ -lactâmico que poderia, em condições normais, ser rapidamente desativado pela enzima (Hakimelahi *et al.* 2002).

Embora tenham sido desenvolvidos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais potentes com a aplicação das técnicas anteriormente referidas, surgiu o interesse de se estudar os inibidores das enzimas  $\beta$ -lactamases que poderiam de alguma forma potencializar a ação

destes antibióticos. Pesquisadores da Beecham Pharmaceutical descobriram e isolaram o composto  $\beta$ -lactâmico ácido clavulânico (AC), caracterizado como um potente inibidor destas enzimas, composto obtido de cultura de bactéria do gênero *Streptomyces*.

## 2.2. Metabólitos Secundários

As atividades metabólicas associadas ao crescimento celular compõem o metabolismo primário, onde os metabólitos produzidos, conhecidos como metabólitos primários, são principalmente enzimas, ácidos orgânicos e etanol, entre outros. No entanto, em muitos microrganismos, verifica-se a síntese de compostos não essenciais ao crescimento, os quais são produzidos no final da fase de crescimento ou durante a fase estacionária. Esses compostos são denominados metabólitos secundários, sendo produzidos por diversos tipos de microrganismos (Vining, 1986).

Sabe-se que os metabólitos secundários não desempenham um papel direto no metabolismo energético nem no crescimento celular, embora contribuam seguramente para a sobrevivência do microrganismo, já que inibem a ação de competidores que possam ocupar o mesmo nicho ecológico. Porém, é importante ressaltar que as vias do metabolismo secundário requerem precursores gerados pelo metabolismo primário.

O metabolismo secundário pode ser observado em plantas, microrganismos, tanto procariontes quanto eucariontes e, até mesmo, em alguns animais como artrópodes e insetos (Vining, 1986). De todos os produtos tradicionais obtidos por processos fermentativos, os mais importantes para a saúde humana são os metabólitos secundários (Sanchez *et al.*, 2002).

Microrganismos que excretam metabólitos secundários apresentam inicialmente um período de crescimento celular, a trofofase. Quando este crescimento cessa pelo esgotamento de um ou mais nutrientes essenciais, inicia-se a fase conhecida por idiofase, onde a síntese dos metabólitos secundários é disparada (Phaff, 1981).

A grande importância dos metabólitos secundários deve-se à grande variedade de atividade biológica destes compostos, empregados como antibióticos, fungicidas, antitumorais, inibidores de enzimas e pigmentos, entre outras aplicações (Inoue, 2001).

Membros do gênero bacteriológico *Streptomyces* caracterizam-se pela grande capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários, muitos deles com poder antibiótico, sendo o ácido clavulânico um importante metabólito secundário produzido pela espécie *clavuligerus*, entre outras.

### 2.3. *Streptomyces clavuligerus*

*Streptomyces* é o principal gênero da família *Streptomycetaceae*, ordem *Actinomycetales* (Lechevalier e Lechevalier, 1981). São bactérias Gram positivas e possuem um elevado conteúdo de G+C (69-78%) (Korn-Wendisch e Kutzner, 1992). Eles produzem micélio aéreo e vegetativo extensivamente ramificado. As hifas reprodutoras têm um diâmetro aproximado de 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  (Alexander, 1977). O crescimento deles ocorre pelos ápices das hifas acompanhado da formação de ramificações. Ao envelhecer as colônias produzem o micélio aéreo (esporóforos) o qual se desenvolve dando origem a cadeias de esporos (conídios). Segundo Whitaker e Long (1973), o crescimento de organismos filamentosos pode se dar na forma de pequenas esferas ( “pellets”) ou na forma de hifas dispersas (forma filamentosa). Conforme esses autores, a estrutura dos “pellets” também é variável. As hifas podem estar arranjadas soltas ou fortemente compactadas, formando “pellets” com a superfície lisa (“smooth pellets”) ou “pellets cabeludos” (“hairy pellets”).

Os estreptomicetos, assim como outros actinomicetos, apresentam uma forma característica de instabilidade genética. Várias características, como formação de micélio aéreo e de esporos, produção de antibiótico e resistência são irreversivelmente perdidas, o que é resultado de deleção de grandes regiões de DNA (Lancini e Lorenzetti, 1993).

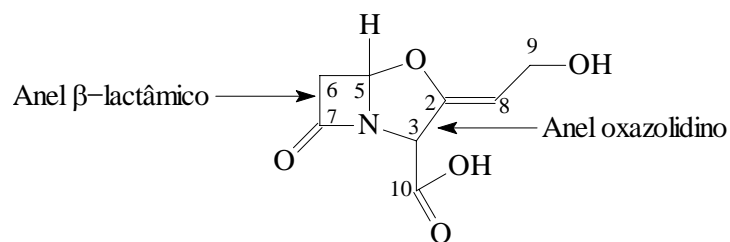
Balows *et al.* (1992) relatam que *Streptomyces* são capazes de degradar resíduos de plantas e animais incluindo polissacarídeos, proteínas e compostos aromáticos. Embora seja capaz de degradar compostos mais complexos, espécies de *Streptomyces* necessitam somente de uma fonte de carbono orgânico, fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns sais minerais. Também não requerem vitaminas ou fatores de crescimento. Os actinomicetos são estritamente aeróbios necessitando, portanto, de oxigênio para o seu desenvolvimento.

Os *Streptomyces* é um dos mais importantes microrganismos do ponto de vista industrial (Neves *et al.*, 2001). O grupo dos actinomicetos se caracteriza por possuir a maioria das espécies produtoras de antibióticos conhecidas atualmente. Espécies de *Streptomyces* são produtoras de mais ou menos 60% das substâncias antibióticas conhecidas (Lima *et al.*, 1975).

Romero *et al.*, (1984) destacam que a característica mais importante da bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus* é a sua capacidade de produzir antibióticos. Atualmente, sabe-se que esta bactéria é capaz de produzir cerca de 21 metabólitos secundários, incluindo vários compostos  $\beta$ -lactâmicos como a penicilina N, a cefamicina C, a desacetocefalosporina C e o ácido clavulânico.

## 2.4. Ácido Clavulânico

Devido ao aumento da resistência de algumas bactérias aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ao longo dos anos, houve necessidade de encontrar inibidores de  $\beta$ -lactamases para serem utilizados em conjunto com esses antibióticos, visando melhorar a sua eficiência. Atualmente, pode-se citar como inibidores de  $\beta$ -lactamases, o valclavan, as clavamicinas e o ácido clavulânico, sendo todos do subgrupo “clavam” do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos (Baggaley *et al.*, 1997). O ácido clavulânico apresenta na sua estrutura anéis  $\beta$ -lactâmico e oxazolidino, tal como visto na Figura 2.3. Esta estrutura não ocorre naturalmente em compostos  $\beta$ -lactâmicos, sendo o ácido clavulânico o único que apresenta uma molécula de oxigênio na posição 1.



**Figura 2. 3: Fórmula estrutural do ácido clavulânico**

O ácido clavulânico tem fraca ação antibacteriana contra a maioria dos microrganismos, mas é um potente inibidor de uma grande variedade de  $\beta$ -lactamases, sendo capaz de tornar possível a atividade antibacteriana de penicilinas e cefalosporinas contra muitas bactérias resistentes produtoras de  $\beta$ -lactamases. Esta capacidade é atribuída à preservação de adequadas concentrações do antibiótico pela inibição das  $\beta$ -lactamases. Com isso, o ácido clavulânico é encontrado em medicamentos na forma de sais de metais alcalinos, como clavulanato de potássio, em conjunto com antibióticos, como a amoxicilina. As formulações desses medicamentos e modo de uso estão patenteadas pelo Beecham Research Laboratories.

Tal combinação vem sendo amplamente receitada para o tratamento de várias infecções provocadas por bactérias. As vendas da GlaxoSmithKline de Augmentin, contendo amoxicilina mais clavulanato de potássio, foi de 1,19 bilhões de libras em 2002, apresentando



uma queda de vendas que ficaram em 825 milhões de libras em 2003, devido ao aparecimento de similares no mercado.

Cabe ressaltar que existem em literatura muitos trabalhos recentes relacionados com a utilização de ácido clavulânico em tratamentos contra infecções causadas por bactérias patogênicas.

## **2.5. Formas de preservação e armazenamento de *Streptomyces***

A preservação de microrganismos por meio da aplicação de metodologias que propiciem a manutenção das propriedades genéticas e morfológicas originais por longos períodos é de fundamental importância para que esses permaneçam disponíveis como material de referência. As coleções de culturas de microrganismos são centros de conservação de cepas e de recursos genéticos. Tornaram-se depositárias de amostras ou cepas de referência ("strains") e são responsáveis pela manutenção desses microrganismos vivos e sem variações genéticas e pelo atendimento aos pedidos de tais amostras, para fins industriais, de pesquisa e de ensino. Para a sua manutenção podem ser empregados diferentes métodos visando garantir sobrevivência, estabilidade e pureza de isolados durante períodos prolongados de tempo, mantendo-os inalterados morfológica e fisiologicamente.

A preocupação com a manutenção de culturas viáveis iniciou-se simultaneamente à descoberta dos meios artificiais de cultivo, pois a disponibilidade de microrganismos sempre foi considerada essencial ao desenvolvimento da Microbiologia.

Há vários métodos e práticas para manter e preservar microrganismos, isso dependendo na maior parte das propriedades biológicas dos mesmos. Figueiredo (2001), estudando métodos de preservação de fungos patogênicos, afirmou que a variedade dos métodos recomendados e descritos na farta literatura, de certa forma, reflete a falta de um método que seja abrangente e satisfatório para todos os fungos e salientou que muitas das técnicas empregadas para manutenção de fungos originaram-se de técnicas desenvolvidas para preservação de outros microrganismos, principalmente, bactérias.

Culturas bacterianas devem ser preservadas para a utilização com fins didáticos e de pesquisa (Mariano e Assis, 2000). O organismo deve ser mantido vivo pelo maior período possível e por um método que não permita ou minimize a ocorrência de mutações ou de variabilidade quanto à patogenicidade, virulência ou características básicas da cultura original (Romeiro, 2001).

Alguns métodos especiais de preservação apropriados para manter microrganismos por poucos anos, incluem métodos simples, tais como, a preservação de esporos e células em suportes como solo estéril, esferas de vidro e plástico, discos de papel ou de gelatinas. A liofilização pode ser indicada para preservação por longa duração; congelar a seco e armazenar em nitrogênio líquido são apropriados para a maioria dos micróbios e é realmente o método preferido da maioria dos serviços de coleção de culturas. Tem se verificado vida média de 25 anos ou mais, usando esse método, dependendo da espécie preservada (Hill, 1981).

A liofilização consiste na remoção do vapor d'água diretamente das amostras congeladas e continuada secagem sob vácuo, até produção de material estável. É considerado um dos mais efetivos métodos de preservação para a maioria dos microrganismos, sendo, entretanto, menos aplicável para algas e inadequado para protozoários (Costa e Ferreira, 1991).

As vantagens do processo são: a) a desidratação a partir do estado de congelamento é considerada como vantajosa devido a remoção da água de estruturas rígidas mantidas pelo congelamento; b) não é necessário o emprego de equipamento dispendioso; c) a manutenção da viabilidade dos microrganismos por muitos anos, sem alterações de suas características genéticas. As desvantagens do processo são: a) impossibilidade de seu emprego para certos fungos que não suportam o processo, perdendo a viabilidade; b) cada tubo liofilizado somente pode ser utilizado uma só vez, pois após a abertura das ampolas, e em contato com o ar o microrganismo deve ser semeado imediatamente para não perder a viabilidade. (Figueiredo, 2001).

A conservação em criotubos, tanto de esporos como de micélio, e a liofilização são métodos que garantem a disponibilidade de inóculo durante longos períodos, para utilização em experimentos e cultivos, que podem evitar possíveis alterações genéticas no microrganismo, com efeitos negativos na capacidade produtiva.

Os actinomicetos crescem facilmente em condições laboratoriais, mas várias subculturas podem ter efeito negativo na produção de metabólitos secundários, dentre estes os antibióticos. Linhagens podem ser mantidas por períodos de tempos variáveis usando diferentes técnicas que previnem, em diferentes graus, mudanças nas características morfológicas, fisiológicas e genéticas das espécies (Taddei *et al.*, 1999).

As condições de reativação, o tipo de meio de cultura, a temperatura, e a agitação, afetam o crescimento da cultura preservada e em geral o método de preservação.

Para reativar culturas deve-se sempre levar em conta a condição da cultura, o tempo de conservação e tentar a reprodução das condições ideais do crescimento do microrganismo preservado e do método de conservação escolhido (Taddei *et al.*, 1999).

Yocheva *et al.*, (2002) mostraram a influência da preservação por longa duração no estado liofilizado, em relação à sobrevivência, a morfologia e atividade antibiótica, de três linhagens de *Streptomyces*. Concluíram que a viabilidade das linhagens não depende somente das condições de liofilização, mas também do estado fisiológico e das características das linhagens. Observaram que depois de algum tempo houve um aumento de polimorfismo e novos tipos morfológicos e que o método de liofilização foi o mais apropriado para armazenamento por longa duração quando se tratava da atividade antibiótica. A maioria das bactérias, actinomicetos e muitos fungos, inclusive os leveduriformes, responde bem a essa técnica, mesmo considerando que o número total de células que sobrevivem ao processo em cada operação seja relativamente pequeno.

Com esses métodos é importante o emprego de crioprotetores, grupo heterogêneo de substâncias de alta afinidade pela água que contribuem para a vivência da célula durante a crioconservação. Os crioprotetores diminuem o ponto de congelamento do sistema e reduzem a quantidade e o tamanho dos cristais de gelos durante o esfriamento, contribuindo para a proteção física das membranas e impedindo o aumento da concentração do produto iônico no congelamento (Ghera, 1981).

Muitos agentes crioprotetores são indicados com sucesso para a liofilização, como glicerol a 10% v/v, leite desnatado a 10% v/v, inositol a 10% ou 12% m/v, rafinose a 5 ou 10% m/v e trealose a 10% m/v. Podlech *et al.*, (1996), avaliando diferentes crioprotetores na conservação de *Saccharomyces boulardii* por liofilização, concluíram que a combinação das soluções de leite desnatado e trealose 10% m/v foi a que proporcionou melhor crioproteção às células da levedura. Gouveia (2001) realizou experimentos com *Streptomyces clavuligerus* utilizando esporos conservados, porém atualmente conserva-se o microorganismo na forma de células vegetativas em criotubos para manter o microorganismo na forma ativa para os experimentos planejados (Rosa *et al.*, 2004).

*S. clavuligerus*, como a maioria das linhagens de interesse industrial, é capaz de reproduzir-se por esporulação assexuada, sendo uma prática comum a utilização de suspensão de esporos durante os passos iniciais de obtenção de inóculo (Hockenhill, 1980). Também se utiliza para propagar este microrganismo células vegetativas (micélio) tanto em

laboratórios de pesquisa como em procedimentos industriais de produção de grandes volumes de meio requeridos para inocular os fermentadores.

### **2.5.1. Agentes Crioprotetores**

Uma multiplicidade de fatores afeta a eficácia da criopreservação de microorganismos como, por exemplo, a espécie, a linhagem, a forma e tamanho das células, a fase e a velocidade de crescimento, temperatura de incubação, composição do meio de crescimento, pH, osmolaridade e aeração, teor de água da célula, composição de lípidos das células, densidade de congelamento, composição do meio de congelamento, velocidade de refrigeração, temperatura e duração de armazenamento e a velocidade de aquecimento (Ashwood-Smith, 1980). Uma das condições mais importantes é a composição do meio utilizado para suspender os organismos congelados. Embora uma boa sobrevivência dos micróbios ultra-congelados (bactérias e esporos microbianos) tem sido ocasionalmente observada sem uma proteção aditiva, a presença de um adequado agente crioprotetor geralmente aumenta consideravelmente a sobrevivência. A descoberta de que glicerol e o dimetilsulfoxido (Me<sub>2</sub>SO) protegem células eucarióticas, incluindo certas células microbianas, contra os danos de congelamento, marcou o início da moderna criotecnologia (Lovelock e Bishop, 1959).

Os crioprotetores aditivos (CPAs) utilizados na criopreservação de microorganismos (bactérias, fungos, algas, protozoários) e de vírus, incluem uma variedade de simples e mais complexos compostos químicos, mas apenas alguns deles têm sido amplamente utilizada e com resultados satisfatórios estes incluem: dimetilsulfoxido (Me<sub>2</sub>SO), glicerol, sangue ou soro albumina, leite desnatado, peptona, extrato levedura, sacarose, glicose, metanol, sorbitol e extrato de malte.

Muitas comparações das atividades dos crioprotetores mais utilizados, com base em artigos publicados, indicam que os mais bem sucedidos CPAs são Me<sub>2</sub>SO, metanol, etilenoglicol, propilenoglicol e soro ou albumina, enquanto que glicerol, polietilenoglicol, e sacarose são menos bem sucedidos. Outros açúcares, dextrana, hidroxietilcelulose amido, sorbitol e leite são os menos eficazes. No entanto, dióis, assim como alguns outros CPAs são tóxicos para muitos micróbios. Me<sub>2</sub>SO pode ser considerado como mais usado universalmente, embora alguns outros CPAs podem, por vezes, trazerem melhores recuperações para determinados organismos em particular. No entanto, o melhor CPA ou

combinação de CPAs para otimizar a preservação de um determinado microrganismo “criosensível” deve ser determinado experimentalmente.

CPAs podem ser classificados de diversas maneiras, como por exemplo, aditivos de baixo ou alto peso molecular (Nash, 1966). A mais tradicional divisão de CPAs (Meryman, 1971) depende da sua taxa de penetração na célula: aqueles que penetram rapidamente, geralmente dentro de 30 min, incluem metanol, etanol, etilenoglicol (EG), 1 propilenoglicol (PG), dimetilformamida, e Me<sub>2</sub>SO. Glicerol que penetra mais lentamente e mono, oligo e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextrano, amido hidroxietílico (HES), metil celulose, albumina, gelatina, outras proteínas, polietilenoglicol (PEG), óxido de polietileno (PEO) ou álcool polivinílico são todos não penetrantes ou compostos não permeáveis que causam crioproteção extracelular quando presente em concentrações de 10-40% (v/v). A permeabilidade de alguns destes solutos, como o glicerol, depende acentuadamente da temperatura e o tipo de célula. Alguns CPAs penetrantes podem ser considerados compostos de baixa permeabilidade sob certas circunstâncias. Além disso, alguns CPAs penetram apenas a parede celular e não a membrana citoplasmática. Assim, três categorias de aditivos podem ser consideradas (Tao e Li, 1986): (1) CPAs penetrantes na parede celular e na membrana citoplasmática (Me<sub>2</sub>SO e glicerol), (2) CPAs penetrantes na parede celular, mas não na membrana citoplasmática (mono e dissacarídeos, aminoácidos, polímeros, com um baixo peso molecular, como por exemplo, PEG-1000), e (3) CPAs que não penetram nem na parede celular (polímeros com maior massa molar de proteínas, polissacarídeos, PEG-6000, dextrana).

## **Glicerol**

Glicerol (1,2,3-propanotriol), juntamente com Me<sub>2</sub>SO, tem sido o mais amplamente utilizado em microbiologia. O efeito de crioproteção do glicerol foi descoberto muito mais cedo do que normalmente é indicado (Polge, 1949). Keith (1913) observou que uma adição de 5 a 42% (v/v) de glicerol a suspensões de *Escherichia coli* em água permitiu a sobrevivência de longo prazo desta bactéria à -20°C. Não diluído ou 50% (v/v) de glicerol foi adotado para a preservação de rotina de um vírus patogênico a temperaturas entre 4 e -20°C, muito tempo antes de 1950. Mais tarde, glicerol foi aplicado em concentrações de 2 a 55% (v/v) (mediana de 10%), para o congelamento de diversos vírus; bactérias, incluindo e micoplasmas; fungos filamentosos, leveduras; algas; e protozoários. Certos fungos filamentosos sobreviveram ao congelamento melhor protegidos com glicerol do que com

Me<sub>2</sub>SO. Glicerol também teve um pequeno ou nenhum efeito protetor para os gêneros bacterianos *Methylomonas*, *Methylococcus*, e *Methylocystis*, *Spirillum* e *Anaplasma*. No entanto, a toxicidade de glicerol tem sido observada em *Aegyptianella pullorum*, *Chlamydia spp.*, *Rhodospirillum rubrum*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium diphtheriae*, *E. coli*, *Trypanosoma spp.*, onde o grau de toxicidade é muito superior do que em uma solução de citrato em PBS (Hubálek, 2003).

### **Sorbitol**

De acordo com Hubálek, (2003) sorbitol tem sido utilizado em criomicrobiologia em concentrações entre 1 e 36% (v/v) (mediana de 9%).

### **Trealose**

Trealose é um CPA natural presente em células de levedura e de vegetais. Tem sido usada em concentrações de 5 a 19% (v/v) (mediana de 10%) como um CPA para certos vírus, (Hubálek, 2003).

### **Lactose**

Lactose em concentrações de 1 a 10% (v/v) (mediana 8%) forneceu uma melhor proteção do que o glicerol em fermentos de *Lactobacilos. lactis ssp.* armazenados a -20 a -70°C. Lactose foi igualmente eficaz para o congelamento de *E. coli*. Uma mistura de 5% e 10% (v/v) de lactose e glicerol produziu bons resultados, superiores do que apenas com glicerol ou Me<sub>2</sub>SO com *S. cerevisiae*, *Pseudomonas aureofaciens*, e *S. tenebrarius*, (Hubálek, 2003).

### **Misturas de agentes crioprotetores**

CPAs podem interagir uns com os outros em misturas ou nas moléculas das células, produzindo assim efeitos diferentes daqueles que ocorrem com CPAs empregados isoladamente. Numa mistura, o efeito de um composto pode sobrepor ao do(s) outro(s) ou eles podem combinar para produzir efeitos aditivos ou sinérgicos. Observou-se que o efeito protetor de combinações de CPAs pode ser maior do que se poderia esperar em comparação

com às ações aditivas dos agentes. Muitas vezes é aconselhável a utilização de combinar o penetrante rápido e o não penetrante (ou penetrante lento) na crioproteção. Mesmo três CPAs podem ser combinados, como por exemplo Me<sub>2</sub>SO com glicose e PEG (Hubálek, 2003).

### **2.5.2. Criopreservação**

Microrganismos isolados e identificados, quando preservados por processos adequados, como, por exemplo, liofilização ou ultra-congelamento, podem ser armazenados por longos períodos, conservando suas características genéticas e propriedades industriais. Para garantir a reprodutibilidade dos resultados e a continuidade na investigação biomédica e de processos, hoje, pesquisadores são confrontados com a missão de estabilizar geneticamente células vivas.

Estabilizar células em temperaturas criogênicas é chamado de criopreservação, um aspecto da criobiologia aplicada, ou o estudo da vida a baixas temperaturas.

A criopreservação ou a conservação a baixas ou ultrabaixas temperaturas permite deter os processos metabólicos e a deterioração das células durante longos períodos, mantendo a estabilidade genética do material criopreservado. É um tema que até hoje não foi totalmente esclarecido e existe uma vasta literatura sobre o assunto, que muitas vezes é contraditória (Figueiredo, 2001).

A estocagem a  $-70^{\circ}\text{C}$  tem sido utilizada com sucesso para diferentes microrganismos, como bactérias, micoplasmas, fungos, protozoários e bacteriófagos (Costa e Ferreira, 1991).

Nesse método deve-se respeitar fatores como a velocidade de descongelamento, condições de crescimento, idade do cultivo, etc. Muitos microrganismos não toleram mudanças muito bruscas de temperatura e certos intervalos entre 0 e  $-15^{\circ}\text{C}$  têm sido reconhecidos como críticos ou letais. Para manter-se a viabilidade de alguns microrganismos parece mais conveniente congelar lentamente e descongelar rapidamente, enquanto que para outros ocorre o inverso. Este processo também chamado de "deep freezing" consiste em submeter-se o material a temperaturas de até  $-100^{\circ}\text{C}$ , sendo as mais corriqueiras de  $-60^{\circ}\text{C}$ , e tem sido mais extensivamente usado para preservação de bactérias (Figueiredo, 2001).

O congelamento e o descongelamento acarretam danos celulares, que se manifestam por vários níveis de alterações. Esta crio-injúria pode ser resultante de choque

térmico, do efeito na concentração do soluto intra e extracelular; da desidratação; da formação do gelo interno; da recristalização do gelo interno e formação de um volume mínimo da célula (Costa e Ferreira, 1991).

De acordo com o Manual de Criopreservação (Nalge Nunc International) estudos de criobiologia levaram a especulação sobre o que ocorre durante o congelamento de células vivas e como fenômenos adversos podem ser superados. Uma vez que a água é o principal componente de todas as células vivas e deve estar disponível para os processos químicos de vida que podem ocorrer, o metabolismo celular pára quando toda água no sistema é convertida em gelo.

Durante o processo de congelamento há diferentes velocidades de formação de cristais de gelo. Durante o resfriamento lento, ocorre o congelamento externo da célula antes de formar gelo intracelular (Figura 2.4). Como forma gelo, a água é retirada do ambiente extracelular, ocorrendo um desequilíbrio osmótico em toda membrana celular levando à migração de água para fora da célula.

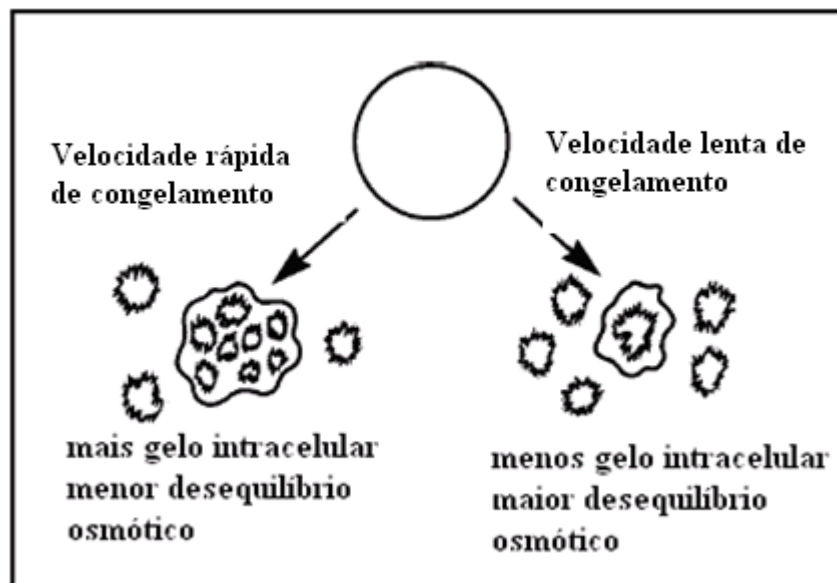


Figura 2. 4. Velocidade de congelamento de 1°C/minuto de um agente crioprotetor para minimizar o dano devido o desequilíbrio osmótico da formação de cristais de gelo.



O aumento da concentração de soluto fora da célula, bem como intracelular, pode ser prejudicial para a sobrevivência da célula (Farrant, 1980). Se muita água permanece no interior da célula, devido à formação de cristais de gelo, podem ocorrer danos durante o aquecimento.

A velocidade de congelamento é de extrema importância sobre este fenômeno. Resfriamento rápido minimiza os efeitos da concentração de solutos como, formas de gelos uniformes, mas conduz a uma maior formação de gelo intracelular. Resfriamento lento, por outro lado, resulta em uma maior perda de água da célula e menor quantidade de gelo interno, mas aumenta os efeitos de solutos. Células permeáveis afetam a velocidade da perda de água; mas são capazes de tolerar congelamento rápido melhor do que células menos permeáveis (Nei *et al.*, 1969).

Mazur *et al.*, (1972) relatam que tanto as formações de cristais de gelo como os efeitos de solutos desempenham um papel na inativação da célula e que uma ótima velocidade de congelamento minimiza o efeito de cada um. Com poucas exceções, é preferida uma velocidade de 1°C por minuto. Uso de agentes crioprotetores durante o congelamento pode também minimizar os efeitos negativos e aumentar a concentração de solutos e formação de cristais de gelo.

O efeito das baixas temperaturas sobre os microrganismos depende da espécie microbiana e da intensidade de aplicação. Acredita-se que algumas bactérias vivam por muito tempo em temperaturas de congelamento, desde que sejam mantidas em meios crioprotetores como o glicerol, lactose e sólidos não gordurosos (Ângelo *et al.*, 2007).

O processo de criopreservação às vezes exige a adição de substâncias químicas ou naturais protetoras como glicerol, soro, leite, propilenoglicol, etc. O uso do glicerol como agente crioprotetor tem oferecido excelentes resultados na preservação da viabilidade e virulência de *Leptospira sp.*, sendo atualmente este um método tradicionalmente empregado para a conservação de coleções de culturas microbianas no nível internacional (Maura *et al.*, 2006). É um método rápido, fácil, não demanda manipulação durante a estocagem e não requer grande espaço. A estocagem quando feita em nitrogênio líquido permite manter por longo tempo a viabilidade e é útil para microrganismos mais fastidiosos (Costa e Ferreira, 1991). No entanto, o seu custo é elevado. De acordo com Figueiredo (2001), a maior

limitação ao emprego desse método é que o mesmo é muito dispendioso, uma vez que exige refrigeradores especiais capazes de produzir temperaturas muito baixas (-60 a -100°C).

Observando a literatura pesquisada, nota-se que há poucos trabalhos que abordam a preservação e armazenamento de *Streptomyces sp.*, logo o estudo da avaliação de formas de preparação de estoques de trabalho na preservação de *Streptomyces clavuligerus* representa uma grande contribuição nesse assunto, bem como vem somar para a melhoria do processo de produção de ácido clavulânico.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Microrganismo**

Foi utilizado como microrganismo a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, obtidos comercialmente na forma liofilizada.

#### **3.2. Meios de Cultura**

##### **3.2.1. Meios de Cultura de Preparo de Criotubos**

###### **3.2.1.1. Meio de Cultura de Esporulação**

Na obtenção de esporos de *S. clavuligerus* para a preparação do estoque de trabalho de criotubos foi utilizado o meio de cultura de esporulação de Sánchez e Braña (1996) modificado com a inclusão de MOPS, meio definido por Lavarda (2003) como o melhor meio de cultura de esporulação. Tal meio apresenta a seguinte composição (em g.L<sup>-1</sup>): extrato de levedura (0,5), extrato de carne (0,5), caseína hidrolisada ácida (1,0), glicose (5,0), MOPS (21,0), ágar (20,0), pH 7,0.

###### **3.2.1.2. Meio de Cultura para a Obtenção de Células Vegetativas**

Na etapa de propagação do micélio para a obtenção de estoque de trabalho de criotubos de células vegetativas foi utilizado o meio de cultura de ISP1 modificado com a inclusão de extrato de malte, que apresenta a seguinte composição (em g.L<sup>-1</sup>): extrato de malte (10,0), triptona (5,0), extrato de levedura (3,0), MOPS, (21,0), pH 6,8 ajustado com NaOH.

###### **3.2.2. Meio de Cultura para Teste da Viabilidade Celular**

Para os testes de viabilidade celular foi utilizado o meio de cultura de esporulação de Sánchez e Braña (1996) modificado com a inclusão de MOPS.

### **3.2.3. Meio de Cultura de Reativação (MR)**

Na etapa de avaliação dos microrganismos acondicionados em criotubos, em todos os cultivos foi utilizado o meio de cultura de reativação ISP1 modificado com a inclusão de extrato de malte (item 3.2.1.2).

### **3.2.4. Meios de Cultura de Inóculo (MI) e de Produção (MP)**

Os meios de cultura utilizados nas etapas de preparo de inóculo e de produção tiveram a mesma composição definida por Maranesi et al. (2005) (em  $\text{g.L}^{-1}$ ): farinha de soja desengordurada (20,0), glicerol (10,0), óleo de soja (23,0),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,2), MOPS, (21,0), solução de sais ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,0g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0g; água destilada, q.s.p. 1L) (1 mL), pH 6,8.

## **3.3. Métodos Analíticos**

### **3.3.1. Determinação da Concentração de Glicerol**

Ao longo dos experimentos, o glicerol foi quantificado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), empregando-se coluna Shodex KS-801 e como eluente água deionizada.

### **3.3.2. Determinação da Concentração celular**

No final da etapa de reativação em meio de cultura solúvel, a concentração celular (Cx) foi quantificada pelo método da massa seca após centrifugação das amostras, descarte do sobrenadante, lavagem das células e secagem a  $85^\circ\text{C}$  por 6 horas. Durante os cultivos visando a produção de ácido clavulânico, devido à existência de sólidos insolúveis no meio de cultura, a concentração celular foi avaliada indiretamente a partir de medidas reológicas do caldo fermentativo utilizando um reômetro Brookfield Engineering modelo LV-

DVIII+. Nesse caso, como o caldo se caracteriza como um fluido pseudoplástico ( $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$ ), o índice de consistência (K) se relaciona com a concentração celular (Cx).

### 3.3.3. Determinação da Concentração do Ácido Clavulânico

A concentração de ácido clavulânico foi analisada através do método químico proposto por Bird et al., (1982). O método consiste na análise espectrofotométrica ( $\lambda=311$  nm) do produto da derivatização de ácido clavulânico com imidazol.

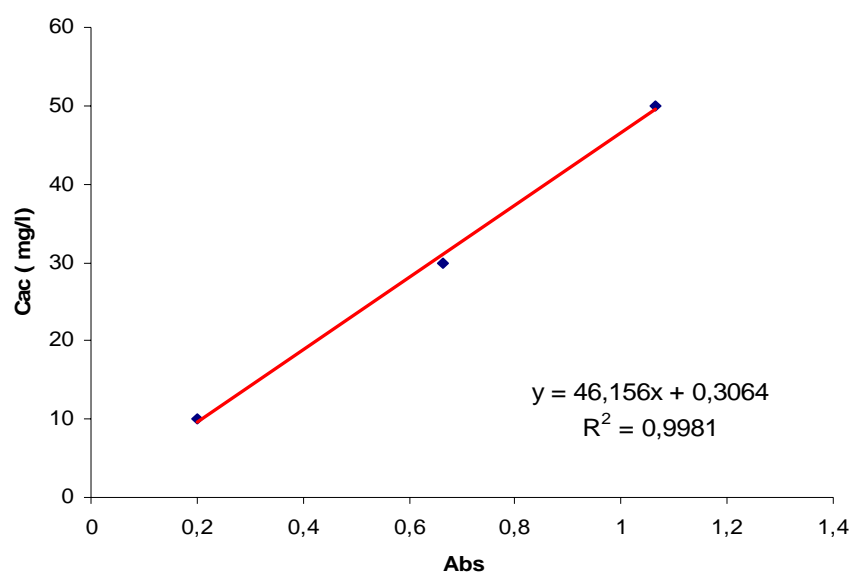
O procedimento experimental foi o seguinte:

Foram preparadas duas soluções diferentes (A e B) em tubos de ensaio, com a mesma amostra. Para a solução A, adicionou-se 5 ml de imidazol (6 g em 100 mL, pH 6,8) em 1 ml de amostra, sendo o branco composto por 5 ml de imidazol e 1 ml de água. Para a solução B, adicionou-se 5 ml de água destilada em 1 ml de amostra, sendo o branco água destilada. A mistura reacional foi aquecida por 15 min a 30°C. Resfriou-se as amostras e mediu-se as absorvâncias ( $\lambda=311$  nm). A absorvância das amostras foram obtidas pela diferença entre as absorvâncias das soluções A e B.

É importante ressaltar que a relação entre a absorvância e a concentração de ácido clavulânico é linear até 50 mg/l. Logo, as amostras devem ser diluídas adequadamente para ficarem dentro desta faixa.

Para obtenção da curva de calibração, ilustrada na Figura 3.1 foram preparadas soluções padrões de clavulanato de potássio de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/l. Os valores experimentais de concentração de ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e de absorvância (Abs) foram relacionados por regressão linear, obtendo-se a seguinte equação de calibração:

$$C_{AC} \text{ (mg/l)} = 46,156 \text{ Abs} + 0,3064 \quad (3.1)$$



**Figura 3.1** Curva de calibração para determinação da concentração de ácido clavulânico.

Procedendo-se experimentalmente da mesma forma para as amostras, pôde-se obter os respectivos valores de concentração de ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) ao longo dos cultivos. As amostras antes de serem analisadas foram submetidas à centrifugação a 4°C e 11000 rpm por 20 minutos e a análise das mesmas se deu a partir do sobrenadante obtido.

#### **3.3.4. Análise da Concentração de Células Viáveis**

A viabilidade de esporos nos criotubos foi avaliada pelo método da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Este método considera que o número de colônias que crescem corresponde ao número de células viáveis presentes na amostra. Deve-se distribuir a amostra a ser examinada sobre a superfície de um meio nutriente, e, após um período de incubação em temperatura apropriada (28°C), contar as colônias formadas expressando os resultados. A Figura 3.2 ilustra as etapas de diluição empregadas na análise de viabilidade celular.

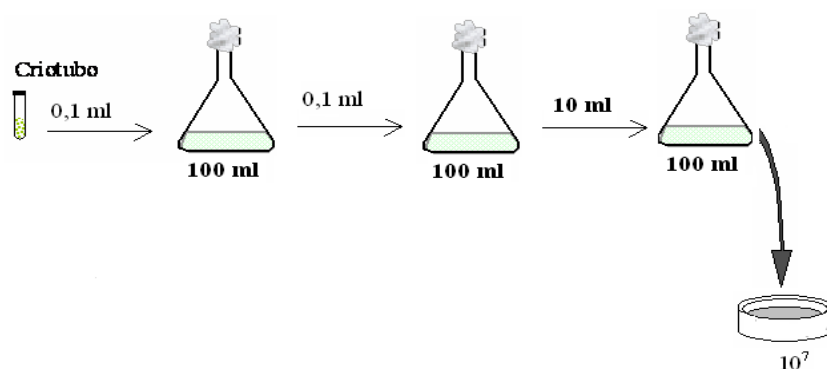
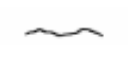
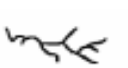




Figura 3.2 Representação do procedimento utilizado para o teste da viabilidade celular.

### 3.3.5. Acompanhamento da Morfologia Celular

Foi avaliada qualitativamente a morfologia celular do microrganismo utilizado a partir de imagens das amostras, observando as presenças de esporos, micélios livres, biopartículas (“pellets”) e fragmentação de hifas. Para tal foi utilizado sistema de aquisição de imagens disponível no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar. A análise das características morfológicas foi realizada através de imagens capturadas por uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio de fluorescência (Olympus BX 50), com lâmpada de mercúrio. As amostras para análise morfológica foram preparadas a partir das amostras retiradas do caldo de cultivo em 144 horas. Distribuíram-se uma gota da amostra numa lâmina de vidro e cobriu-se com uma lamínula. As lâminas foram observadas com uma ampliação de 10, 20 e 40x na objetiva para distinguir facilmente a morfologia.

A Figura 3.3 mostra as classes morfológicas de *Streptomyces olindensis* e suas principais características em cada classe.

Filamento livre não ramificado		40 $\mu\text{m}$ <perímetro < 600 $\mu\text{m}$ Número de pontas: 2
Filamento livre ramificado		40 $\mu\text{m}$ <perímetro < 600 $\mu\text{m}$ Número de pontas > 2
Aglomerado (filamentos emaranhados)		600 $\mu\text{m}$ <perímetro < 12000 $\mu\text{m}$ 100 $\mu\text{m}$ <per. convexo $\leq$ 950 $\mu\text{m}$
Pellet		950 $\mu\text{m}$ <per. convexo < 7200 $\mu\text{m}$

**Figura 3.3.** Classes morfológicas de *Streptomyces olindensis*, apresentando crescimento em meio de cultura e suas principais características em cada classe. Fonte: Pamboukian et. al., 2002.

### 3.4. Metodologia de Preparo de Criotubos

#### 3.4.1. Criotubos de Esporos

A preparação do estoque de trabalho de suspensão de esporos (criotubos de esporos) da linhagem *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 foi desenvolvida de acordo com as seguintes etapas:

- a) Inoculação em meio de cultura específico para a obtenção de esporos: Foi utilizado o meio de cultura de esporulação de Sánchez e Braña (1996) modificado com a inclusão de MOPS, meio definido por Lavarda (2003) como o melhor meio de cultura de esporulação. Criotubos de 3,5 mL de células vegetativas foram utilizados para inocular 5 frascos erlenmeyers de 1L, que foram incubados por mais 20 dias para aumentar a quantidade de esporos;



- b) após período de incubação dos cultivos, 20 mL de solução salina foram adicionados a cada frasco contendo o meio esporulado;
- c) para a obtenção de suspensão de esporos foi realizada agitação vigorosa dos frascos (agitação magnética) e a posterior raspagem dos esporos com auxílio de uma alça de platina esterilizada;
- d) as suspensões de esporos de todos os erlenmeyers foram transferidas para um Erlenmeyer de 1 L, e a seguir foram filtradas com gaze, no intuito de separar algumas partículas provenientes da fragmentação do meio de cultura de esporulação;
- e) por fim, a suspensão foi diluída com solução de glicerol 10 ou 20% v/v e transferidos 3,5 mL para criotubos para serem armazenados em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , definindo o estoque de trabalho de suspensão de esporos.

Foram preparados dois conjuntos de criotubos de suspensão de esporos, diferenciando-se entre si pela concentração de glicerol na solução crioprotetora utilizada na preparação dos criotubos, respectivamente 10 ou 20% v/v de glicerol como agente crioprotetor. Esta foi a variável que foi analisada sua influência na preservação dos esporos de *S. clavuligerus*.

Quando se trabalha com microorganismos, na maioria das vezes deseja-se determinar a concentração de células da suspensão preparada. Uma das formas mais comuns de se obter esta estimativa é através da contagem ao microscópio, utilizando-se uma câmara de Neubauer. Por isso, uma contagem de cada solução de esporos preparada antes de adicionar o glicerol foi realizada em câmara de Neubauer sendo obtidos os seguintes resultados:  $1,5 \times 10^9$  esporos/mL (correspondente ao estoque 10% v/v) e  $5,7 \times 10^7$  esporos/mL (correspondente ao estoque 20% v/v).

Em relação à análise da viabilidade celular, foram tomadas alíquotas de cada conjunto de criotubos (10% e 20% v/v) após 30 dias de congelamento. Foram inoculadas em placas em duplicata com meio de esporulação de Sánchez e Braña (1996) para proceder a contagem de UFC após incubação por um período de 10 dias a uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ . O resultado da viabilidade para o conjunto de criotubos contendo 10% v/v de glicerol resultou num valor médio  $5,0 \times 10^8$  UFC/ml e para os criotubos contendo 20% v/v de glicerol, o valor médio foi de  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml. Esses foram os valores escolhidos como sendo correspondentes a 100% de viabilidade.

### 3.4.2. Criotubos de Células Vegetativas

A preservação da bactéria *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 na forma de estoques de criotubos de células vegetativas, foi realizada seguindo metodologia baseada na proposta de recuperação do microrganismo fornecido pela ATTC (“American Type Culture Collection”):

- a) Criotubos de 3,5 mL de células vegetativas foram inoculados em meio de reativação ISP 1 e incubados a 28°C e 250 rpm por 24 horas.
- b) No caso da preparação de criotubos de células vegetativas com uma única etapa de crescimento, ao final de 24 horas de incubação, a suspensão foi diluída com soluções de glicerol de modo a se obter concentrações de 10 ou 20% v/v de glicerol como agente crioprotetor, respectivamente, e armazenados em ultrafreezer a -70°C;
- c) no caso da preparação de criotubos de células vegetativas com duas etapas de crescimento, ao final de 24 horas de incubação, 5 mL da suspensão foi inoculada em Erlenmeyers de 500 mL contendo 45mL (inóculo de 10% v/v) de meio de cultura de reativação, sendo os mesmos incubados novamente a 28°C e 250 rpm por 24 horas. Da mesma forma que no item anterior, a suspensão foi diluída com soluções de glicerol de modo a se obter concentrações de 10 ou 20% v/v de glicerol como agente crioprotetor, respectivamente, sendo então transferidos 3,5 mL de para criotubos e os mesmos armazenados em ultrafreezer a -70°C;
- d) para avaliar a influência da lavagem das células de *S. clavuligerus* na sua preservação, na preparação de criotubos de células vegetativas com uma ou duas etapas de crescimento, ao final as suspensões foram centrifugadas (4°C e 11000 rpm por 20 minutos), os sobrenadantes foram descartados, o micélio foi ressuscitado e lavado com solução salina (NaCl 0,9% m/v), centrifugado novamente e o sobrenadante descartado. Por fim, o micélio foi diluído com soluções de glicerol com 10 ou 20% v/v, respectivamente, e as suspensões transferidas para criotubos de 3,5 mL e armazenados em ultrafreezer a -70°C.

Devido ao fenômeno de “cold shock” nos *Streptomyces* com relação ao transporte de nutrientes o qual explica como micélios submetidos a uma rápida mudança de temperatura (exemplo: de 30° C a -2° C) em poucos segundos experimentam uma perda reversível do controle da permeabilidade da membrana, evidenciado pelo consumo de

pequena moléculas (Gouveia, 2001), estabeleceu-se submeter as suspensões de micélio e esporos a uma diminuição seqüencial da temperatura, primeiramente uns 30 minutos no congelador e finalmente estocá-las a  $-70^{\circ}\text{C}$  com finalidade de se garantir a manutenção do criotubo, mantendo assim a capacidade produtora de AC pelo microrganismo.

No caso da preservação de *S. clavuligerus* na forma de criotubos de células vegetativas, foram preparados 8 conjuntos de criotubos com o objetivo de avaliar as influências de 3 variáveis na preservação do microrganismo: o número de etapas de crescimento (uma ou duas etapas de 24 horas), a influência da etapa de lavagem do micélio (suspensões de micélios lavados ou não) e a concentração do agente crioprotetor (glicerol 10 ou 20% v/v). Destaca-se que na preparação dos criotubos de esporos ou de células vegetativas, todos os meios de cultura e materiais utilizados foram esterilizados em autoclaves a 2,2 atm e  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, bem como os procedimentos de preparação dos criotubos foram executados em câmara de fluxo laminar.

### **3.5. Metodologia de Avaliação das Formas de Preservação de *Streptomyces clavuligerus***

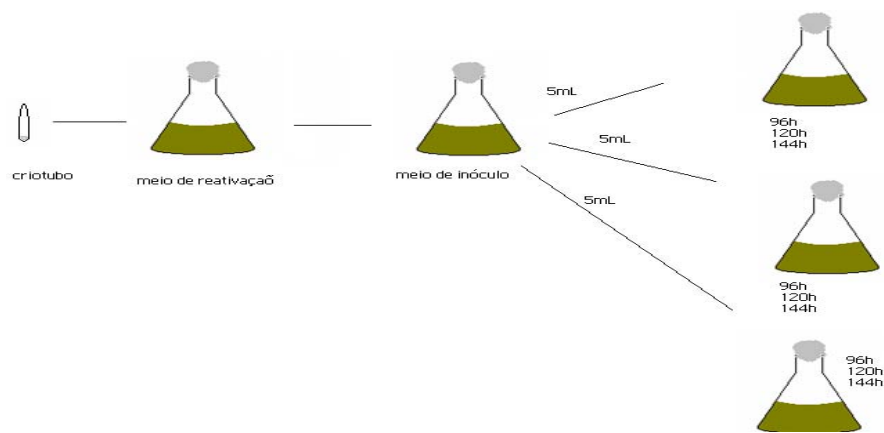
Após a etapa de preparação dos criotubos de esporos e de células vegetativas, há, portanto 10 conjuntos de criotubos preparados e preservados sob diferentes formas. Na Tabela 3.1 é apresentada uma síntese das condições de preparação que foram utilizadas para a preservação da linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.

Os 10 diferentes tipos de criotubos preparados (estoques de trabalho) foram avaliados periodicamente, em intervalos entre 30 e 45 dias, por 12 meses, com relação à sua viabilidade e às suas capacidades de crescimento, consumo de glicerol e de produção de ácido clavulânico.

No caso dos criotubos de esporos, foi avaliada a viabilidade dos esporos armazenados utilizando-se a contagem de colônias formadas (unidade formadora de colônias: UFC) de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.4.

Todos os criotubos foram testados quanto à sua capacidade de produzir ácido clavulânico. Para tal, foram realizados cultivos em triplicata em mesa incubadora rotativa, modelo G25 da New Brunswick Scientific. Em cada cultivo, o conteúdo dos criotubos são adicionados a 50 mL do meio de cultura de reativação (MR) contidos em Erlenmeyers de 500 mL e incubados por 24 horas a 250 rpm. Após esse período 5 mL da suspensão de micélios

reativados (MR) foram inoculados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura para inóculo (MI), sendo então estas culturas incubadas a 28<sup>o</sup>C e 250 rpm por 24 horas. A etapa principal iniciou-se ao se transferir 5 mL da suspensão de inóculo para Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL do meio de cultura de produção. Foram retiradas amostras (5mL), nos tempos de cultivo de 96, 120 e 144 horas, que coincidem com as maiores produções de ácido clavulânico (Maranesi et al., 2005). A Figura 3.4 mostra o esquema experimental para os cultivos em mesa incubadora rotativa.



**Figura 3.4. Esquema experimental para os cultivos em mesa incubadora rotativa.**

Foram avaliadas a reologias e os teores de glicerol e de ácido clavulânico em cada amostra, bem como a concentração e a morfologia celular ao final das etapas de reativação.

**Tabela 3.1** Condições de preservação da linhagem *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064

<b>Estado Fisiológico</b>	<b>Lavagem das Células</b>	<b>Número de Etapas de Crescimento (24 h)</b>	<b>Concentração de Glicerol (% v/v)</b>	<b>Código do Criotubo</b>
Esporos	-	-	10	E-10
Esporos	-	-	20	E-20
Células Vegetativas	sim	1	10	CL-1-10
Células Vegetativas	sim	1	20	CL-1-20
Células Vegetativas	sim	2	10	CL-2-10
Células Vegetativas	sim	2	20	CL-2-20
Células Vegetativas	não	1	10	CNL-1-10
Células Vegetativas	não	1	20	CNL-1-20
Células Vegetativas	não	2	10	CNL-2-10
Células Vegetativas	não	2	20	CNL-2-20

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram realizados 12 ensaios avaliando os 10 diferentes conjuntos de criotubos. A média dos resultados das triplicatas em termos de pH, concentração de ácido clavulânico, K e n (parâmetros reológicos) e produtividade em ácido clavulânico (concentração de ácido clavulânico por tempo) nos cultivos em triplicata encontram-se nos Quadros 4.1 a 4.12, e nas Figuras 4.1 a 4.14.

**Quadro 4.1: Resultados obtidos no 1º ensaio após 30 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	555,8	-	-	5,7
	120	-	491,5	-	-	4,0
	144	6,3	372,6	1,40	1,0	2,6
E-20	96	-	509,0	-	-	5,3
	120	-	523,4	-	-	4,3
	144	5,6	504,6	0,02	1,1	3,5
CL1-10	96	-	718,9	-	-	7,5
	120	-	671,6	-	-	5,6
	144	5,6	576,6	0,09	0,9	4,0
CL1-20	96	-	667,7	-	-	6,9
	120	-	612,8	-	-	4,3
	144	6,5	443,2	0,70	0,8	3,0
CL2-10	96	-	816,2	-	-	8,5
	120	-	698,9	-	-	5,8
	144	7,7	630,4	0,60	0,6	4,4
CL2-20	96	-	532,6	-	-	5,5
	120	-	488,8	-	-	4,0
	144	8,0	478,8	3,20	0,5	3,3
CNL1-10	96	-	671,9	-	-	7,0
	120	-	266,9	-	-	2,2
	144	7,5	40,69	3,70	0,6	0,3
CNL1-20	96	-	737,0	-	-	7,6
	120	-	693,5	-	-	5,8
	144	7,8	763,5	3,20	0,6	5,3
CNL2-10	96	-	549,6	-	-	5,7
	120	-	406,3	-	-	3,3
	144	6,8	624,3	1,00	0,6	4,3
CNL2-20	96	-	853,9	-	-	8,9
	120	-	630,4	-	-	5,2
	144	7,0	562,4	0,50	0,7	3,9

**Quadro 4.2: Resultados obtidos no 2º ensaio após 60 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	886,5	-	-	9,2
	120	-	413,0	-	-	3,5
	144	6,1	828,8	2,00	0,3	5,7
E-20	96	-	374,2	-	-	3,9
	120	-	395,3	-	-	3,3
	144	7,3	406,1	1,80	0,5	2,8
CL1-10	96	-	824,2	-	-	8,6
	120	-	1281,2	-	-	10,7
	144	7,1	1015,8	0,70	0,5	7,0
CL1-20	96	-	188,8	-	-	1,9
	120	-	329,0	-	-	2,8
	144	7,3	350,3	1,30	0,6	2,5
CL2-10	96	-	784,9	-	-	8,2
	120	-	1151,9	-	-	9,6
	144	7,0	1128,0	0,20	0,7	7,8
CL2-20	96	-	164,5	-	-	1,7
	120	-	218,8	-	-	1,8
	144	7,9	146,2	0,90	0,5	1,0
CNL1-10	96	-	925,7	-	-	9,6
	120	-	1182,6	-	-	9,8
	144	7,2	863,4	0,50	0,7	5,6
CNL1-20	96	-	516,5	-	-	5,4
	120	-	454,2	-	-	3,8
	144	6,6	507,9	0,05	1,0	3,5
CNL2-10	96	-	49,8	-	-	0,5
	120	-	241,9	-	-	2,0
	144	8,5	50,9	2,80	0,5	0,4
CNL2-20	96	-	1042,3	-	-	10,8
	120	-	1171,9	-	-	9,7
	144	6,9	998,0	2,50	0,2	6,9



**Quadro 4.3: Resultados obtidos no 3º ensaio após 90 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	736,5	-	-	7,6
	120	-	732,9	-	-	6,1
	144	5,6	799,9	0,03	1,0	5,5
E-20	96	-	794,2	-	-	8,3
	120	-	944,9	-	-	7,9
	144	5,7	555,3	0,03	1,0	3,8
CL1-10	96	-	1291,9	-	-	13,4
	120	-	758,4	-	-	6,3
	144	6,0	746,4	0,10	0,8	5,2
CL1-20	96	-	976,5	-	-	10,2
	120	-	1056,1	-	-	8,8
	144	7,4	730,7	0,20	0,7	5,0
CL2-10	96	-	928,8	-	-	9,7
	120	-	842,6	-	-	7,0
	144	8,0	921,1	1,80	0,5	6,4
CL2-20	96	-	760,7	-	-	7,9
	120	-	839,2	-	-	6,7
	144	7,4	651,1	0,10	0,8	4,5
CNL1-10	96	-	1034,2	-	-	10,8
	120	-	1064,2	-	-	8,8
	144	5,6	912,6	0,50	0,6	6,3
CNL1-20	96	-	697,2	-	-	7,3
	120	-	796,5	-	-	6,6
	144	7,6	917,6	0,30	0,7	6,4
CNL2-10	96	-	615,3	-	-	6,4
	120	-	720,3	-	-	6,0
	144	8,0	481,5	0,70	0,7	3,4
CNL2-20	96	-	1090,3	-	-	11,3
	120	-	952,3	-	-	7,9
	144	6,8	768,7	3,20	0,5	5,3

Quadro 4.4 Resultados obtidos no 4º ensaio após 120 dias de armazenamento

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	839,9	-	-	8,7
	120	-	931,5	-	-	7,8
	144	6,7	859,2	6,20	0,6	5,9
E-20	96	-	686,8	-	-	7,2
	120	-	938,5	-	-	7,8
	144	6,6	874,6	1,00	0,7	6,0
CL1-10	96	-	707,6	-	-	7,4
	120	-	1223,5	-	-	10,2
	144	6,7	825,3	13,00	0,3	5,7
CL1-20	96	-	703,8	-	-	7,3
	120	-	791,5	-	-	6,6
	144	6,9	1039,9	4,10	0,4	7,2
CL2-10	96	-	866,9	-	-	9,0
	120	-	993,0	-	-	8,3
	144	6,7	1004,2	10,90	0,4	7,0
CL2-20	96	-	900,3	-	-	9,4
	120	-	1003,0	-	-	8,4
	144	6,7	1009,2	10,70	0,4	7,0
CNL1-10	96	-	798,4	-	-	8,3
	120	-	1033,0	-	-	8,6
	144	6,8	972,2	5,70	0,4	6,7
CNL1-20	96	-	806,1	-	-	8,4
	120	-	907,6	-	-	7,6
	144	6,9	907,3	3,40	0,4	6,3
CNL2-10	96	-	759,2	-	-	7,9
	120	-	759,6	-	-	7,3
	144	6,9	889,2	4,60	0,4	6,2
CNL2-20	96	-	797,5	-	-	8,3
	120	-	1168,4	-	-	9,7
	144	6,7	1300,8	9,80	0,4	9,0

**Quadro 4.5: Resultados obtidos no 5º ensaio após 150 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	486,0	-	-	5,0
	120	-	706,5	-	-	5,9
	144	6,6	715,7	5,60	0,5	5,0
E-20	96	-	1037,3	-	-	10,8
	120	-	1040,3	-	-	8,6
	144	6,6	828,8	0,05	0,9	5,7
CL1-10	96	-	156,0	-	-	1,6
	120	-	216,0	-	-	1,8
	144	7,6	333,8	20,40	0,3	2,3
CL1-20	96	-	1018,0	-	-	10,6
	120	-	964,2	-	-	8,0
	144	6,7	834,2	6,20	0,4	5,8
CL2-10	96	-	243,7	-	-	2,5
	120	-	199,9	-	-	1,6
	144	7,5	550,7	12,00	0,3	3,8
CL2-20	96	-	853,0	-	-	8,8
	120	-	855,7	-	-	7,1
	144	6,7	1001,8	8,80	0,4	6,9
CNL1-10	96	-	182,6	-	-	1,9
	120	-	146,8	-	-	1,2
	144	7,5	376,5	16,60	0,3	2,6
CNL1-20	96	-	915,7	-	-	9,5
	120	-	831,1	-	-	6,9
	144	6,8	993,	6,90	0,4	6,9
CNL2-10	96	-	992,6	-	-	10,3
	120	-	928,0	-	-	7,7
	144	6,8	1097,2	4,00	0,4	7,6
CNL2-20	96	-	838,0	-	-	8,7
	120	-	1008,8	-	-	8,4
	144	7,0	826,5	12,40	0,3	5,7

**Quadro 4.6: Resultados obtidos no 6º ensaio após 180 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	304,5	-	-	3,2
	120	-	310,7	-	-	2,6
	144	7,3	611,8	19,60	0,3	4,2
E-20	96	-	1037,7	-	-	10,8
	120	-	519,6	-	-	4,3
	144	7,3	503,4	26,60	0,3	3,5
CL1-10	96	-	146,8	-	-	1,5
	120	-	70,7	-	-	0,6
	144	7,4	253,0	3,90	0,4	1,7
CL1-20	96	-	1027,6	-	-	10,7
	120	-	991,5	-	-	8,2
	144	7,2	757,6	16,20	0,4	5,2
CL2-10	96	-	119,2	-	-	1,2
	120	-	207,6	-	-	1,7
	144	7,6	271,5	5,90	0,3	1,8
CL2-20	96	-	483,8	-	-	5,0
	120	-	376,1	-	-	3,1
	144	7,7	303,8	6,90	0,4	2,1
CNL1-10	96	-	100,7	-	-	1,0
	120	-	114,5	-	-	0,9
	144	7,7	186,0	3,60	0,4	1,3
CNL1-20	96	-	1064,2	-	-	11,0
	120	-	899,9	-	-	7,5
	144	7,3	1121,2	21,0	0,4	7,8
CNL2-10	96	-	1157,6	-	-	12,0
	120	-	1058,4	-	-	8,8
	144	7,2	1022,6	0,80	0,5	7,1
CNL2-20	96	-	175,7	-	-	1,8
	120	-	198,8	-	-	1,6
	144	7,5	149,2	11,20	0,3	1,0

**Quadro 4.7: Resultados obtidos no 7º ensaio após 210 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	266,8	-	-	2,7
	120	-	468,8	-	-	3,9
	144	7,5	465,3	4,70	0,4	3,2
E-20	96	-	186,0	-	-	1,9
	120	-	159,5	-	-	1,3
	144	7,3	435,3	13,70	0,4	3,0
CL1-10	96	-	333,8	-	-	3,5
	120	-	190,7	-	-	1,6
	144	7,5	246,0	7,40	0,4	1,7
CL1-20	96	-	133,0	-	-	1,4
	120	-	34,9	-	-	0,3
	144	7,6	373,0	3,40	0,4	2,6
CL2-10	96	-	313,0	-	-	3,3
	120	-	460,7	-	-	3,8
	144	6,9	429,9	13,10	0,3	2,9
CL2-20	96	-	291,0	-	-	3,0
	120	-	124,9	-	-	1,0
	144	7,4	299,2	7,00	0,4	2,0
CNL1-10	96	-	292,2	-	-	3,0
	120	-	393,8	-	-	3,3
	144	7,3	347,6	6,60	0,3	2,4
CNL1-20	96	-	283,0	-	-	2,9
	120	-	169,2	-	-	1,4
	144	7,0	589,9	9,90	0,3	4,0
CNL2-10	96	-	316,5	-	-	3,3
	120	-	562,3	-	-	4,7
	144	7,0	790,8	12,20	0,3	5,5
CNL2-20	96	-	54,5	-	-	0,6
	120	-	137,6	-	-	1,2
	144	8,3	47,6	0,70	0,6	0,3

**Quadro 4.8: Resultados obtidos no 8º ensaio após 240 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	196,8	-	-	2,0
	120	-	179,9	-	-	1,5
	144	7,7	336,1	7,10	0,3	2,3
E-20	96	-	157,2	-	-	1,6
	120	-	196,0	-	-	1,6
	144	7,5	338,4	3,50	0,4	2,4
CL1-10	96	-	269,2	-	-	2,8
	120	-	488,4	-	-	4,0
	144	6,9	361,5	11,50	0,3	2,5
CL1-20	96	-	525,3	-	-	5,5
	120	-	545,3	-	-	4,5
	144	6,9	529,9	15,20	0,4	3,6
CL2-10	96	-	195,3	-	-	2,0
	120	-	180,3	-	-	1,5
	144	7,4	506,8	7,00	0,3	3,5
CL2-20	96	-	63,8	-	-	0,7
	120	-	192,2	-	-	1,6
	144	7,5	343,8	8,40	0,2	2,4
CNL1-10	96	-	325,3	-	-	3,4
	120	-	639,9	-	-	5,3
	144	6,6	903,8	13,20	0,3	6,3
CNL1-20	96	-	388,0	-	-	4,0
	120	-	792,3	-	-	6,6
	144	7,6	656,8	11,20	0,4	4,6
CNL2-10	96	-	509,2	-	-	5,3
	120	-	758,4	-	-	6,3
	144	7,3	625,7	9,20	0,3	4,3
CNL2-20	96	-	328,0	-	-	3,4
	120	-	148,0	-	-	1,3
	144	7,9	323,4	6,20	0,4	2,2

**Quadro 4.9: Resultados obtidos no 9º ensaio após 270 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	472,2	-	-	4,9
	120	-	392,6	-	-	3,3
	144	7,0	576,1	17,50	0,3	4,0
E-20	96	-	598,0	-	-	6,2
	120	-	714,6	-	-	5,6
	144	7,2	661,5	20,70	0,3	4,6
CL1-10	96	-	344,2	-	-	3,6
	120	-	291,0	-	-	2,4
	144	7,3	148,0	13,50	0,3	1,0
CL1-20	96	-	287,6	-	-	3,0
	120	-	499,9	-	-	4,2
	144	6,9	441,5	14,60	0,3	3,0
CL2-10	96	-	508,0	-	-	5,3
	120	-	684,6	-	-	5,7
	144	6,7	786,9	28,70	0,3	5,4
CL2-20	96	-	531,1	-	-	5,5
	120	-	447,6	-	-	3,7
	144	6,6	693,8	29,00	0,2	4,8
CNL1-10	96	-	216,0	-	-	2,2
	120	-	599,2	-	-	5,0
	144	7,2	723,8	22,30	0,3	5,0
CNL1-20	96	-	813,8	-	-	8,5
	120	-	923,5	-	-	7,7
	144	6,9	826,5	20,20	0,3	5,7
CNL2-10	96	-	520,7	-	-	5,4
	120	-	586,5	-	-	4,9
	144	6,8	596,8	22,70	0,30	4,2
CNL2-20	96	-	484,5	-	-	5,0
	120	-	423,8	-	-	3,5
	144	6,9	742,3	27,80	0,3	5,2

**Quadro 4.10: Resultados obtidos no 10º ensaio após 300 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	229,2	-	-	2,4
	120	-	526,8	-	-	4,4
	144	7,0	413,4	6,50	0,30	2,9
E-20	96	-	186,0	-	-	1,93
	120	-	472,3	-	-	3,9
	144	6,8	552,3	10,30	0,32	3,8
CL1-10	96	-	109,9	-	-	1,2
	120	-	253,8	-	-	2,2
	144	7,4	310,7	5,90	0,32	2,2
CL1-20	96	-	366,1	-	-	3,8
	120	-	294,6	-	-	2,5
	144	7,2	229,9	5,60	0,34	1,6
CL2-10	96	-	452,6	-	-	4,7
	120	-	411,1	-	-	3,4
	144	7,0	187,9	12,50	0,36	1,3
CL2-20	96	-	296,9	-	-	2,8
	120	-	268,4	-	-	2,2
	144	6,9	446,9	3,90	0,38	3,1
CNL1-10	96	-	179,2	-	-	1,8
	120	-	244,9	-	-	2,0
	144	7,2	153,8	8,80	0,47	1,0
CNL1-20	96	-	588,4	-	-	6,2
	120	-	143,4	-	-	1,2
	144	7,3	251,8	5,70	0,32	1,8
CNL2-10	96	-	177,6	-	-	1,9
	120	-	158,4	-	-	1,3
	144	7,2	195,3	9,90	0,35	1,4
CNL2-20	96	-	390,4	-	-	4,0
	120	-	415,7	-	-	3,5
	144	6,9	455,7	12,20	0,30	3,2



**Quadro 4.11: Resultados obtidos no 11º ensaio após 330 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	236,8	-	-	2,5
	120	-	211,5	-	-	1,8
	144	7,2	460,7	8,20	0,4	3,2
E-20	96	-	136,5	-	-	1,4
	120	-	135,3	-	-	1,2
	144	7,4	291,0	9,60	0,4	2,0
CL1-10	96	-	149,2	-	-	1,5
	120	-	345,3	-	-	2,8
	144	6,8	197,6	7,10	0,4	1,4
CL1-20	96	-	159,9	-	-	1,7
	120	-	346,1	-	-	2,9
	144	7,1	425,3	11,10	0,4	2,9
CL2-10	96	-	259,9	-	-	2,7
	120	-	193,0	-	-	1,6
	144	6,7	70,7	2,40	0,4	0,5
CL2-20	96	-	394,5	-	-	4,1
	120	-	346,1	-	-	2,9
	144	6,7	425,3	7,70	0,3	3,0
CNL1-10	96	-	243,8	-	-	2,6
	120	-	191,8	-	-	1,6
	144	7,6	144,5	12,00	0,3	1,0
CNL1-20	96	-	180,7	-	-	1,9
	120	-	334,9	-	-	2,8
	144	7,2	247,6	12,20	0,3	1,7
CNL2-10	96	-	375,3	-	-	3,7
	120	-	419,9	-	-	3,5
	144	6,6	190,7	4,50	0,3	1,3
CNL2-20	96	-	326,9	-	-	3,4
	120	-	259,9	-	-	2,2
	144	6,8	189,5	6,10	0,3	1,3

**Quadro 4.12: Resultados obtidos no 12º ensaio após 360 dias de armazenamento**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>pH (-)</b>	<b>C<sub>AC</sub> (mg/l)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>P<sub>AC</sub> (mg/l.h)</b>
E-10	96	-	458,4	-	-	4,7
	120	-	329,2	-	-	2,8
	144	6,5	423,8	17,30	0,4	2,9
E-20	96	-	259,9	-	-	2,7
	120	-	234,5	-	-	1,9
	144	7,7	148,0	14,70	0,5	1,0
CL1-10	96	-	234,5	-	-	2,4
	120	-	183,8	-	-	1,5
	144	7,5	143,8	1,63	0,9	0,9
CL1-20	96	-	316,5	-	-	3,3
	120	-	186,0	-	-	1,5
	144	6,9	440,7	10,70	0,3	3,0
CL2-10	96	-	445,7	-	-	4,6
	120	-	189,5	-	-	1,6
	144	6,9	265,7	11,80	0,4	1,8
CL2-20	96	-	375,3	-	-	3,9
	120	-	249,6	-	-	2,0
	144	6,5	195,3	6,40	0,3	1,4
CNL1-10	96	-	349,9	-	-	3,6
	120	-	336,1	-	-	2,8
	144	6,8	349,9	2,20	0,4	2,5
CNL1-20	96	-	419,9	-	-	4,4
	120	-	246,0	-	-	2,0
	144	6,8	265,7	4,10	0,4	1,8
CNL2-10	96	-	150,3	-	-	1,6
	120	-	301,5	-	-	2,5
	144	6,9	266,9	7,90	0,5	1,9
CNL2-20	96	-	366,1	-	-	2,6
	120	-	326,9	-	-	2,8
	144	7,0	151,5	9,30	0,3	1,0

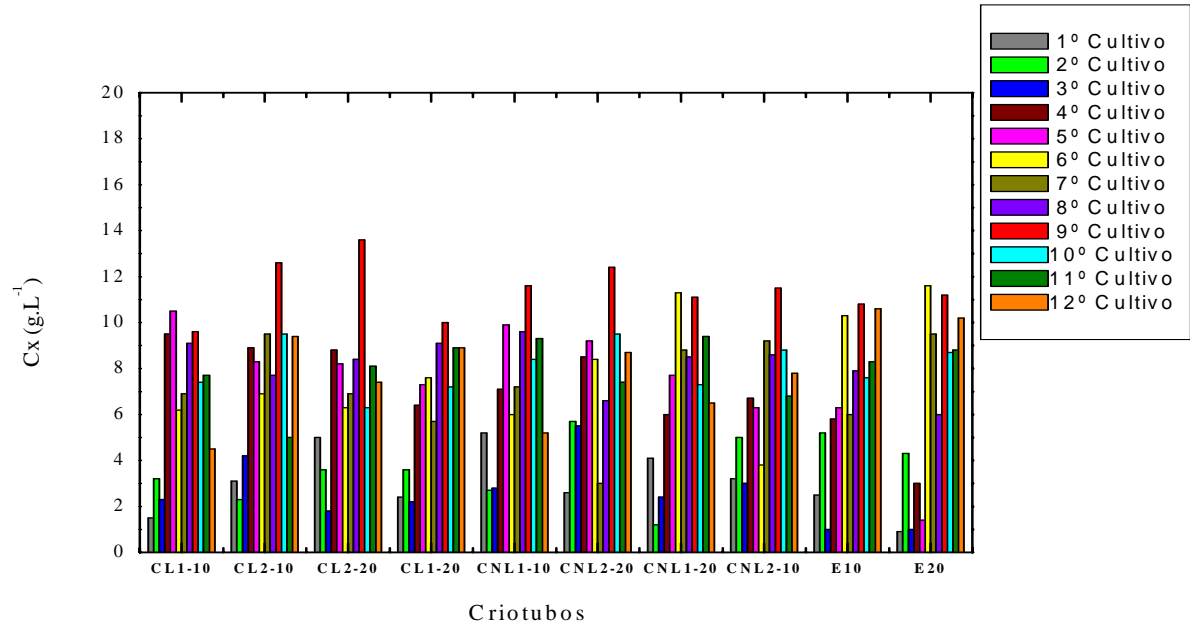
Como pode ser observado nos Quadros 4.1 a 4.12, são apresentados resultados referentes a 3 tempos de cultivo, 96, 120 e 144 horas, respectivamente, pois dependendo da cinética do processo, o valor máximo de produção de AC pode ocorrer em diferentes tempos e, de acordo com Maranesi *et al.*, (2005), esse tipo de cultivo tem a produção máxima em tempos mais adiantados (96, 120 e 144 horas). Para análise preliminar dos resultados, foram utilizados os valores máximos de cada conjunto de criotubo, independentemente do tempo de cultivo.

Em vista dos resultados, observa-se que há uma grande variação de pH do caldo, variando numa faixa de 5,6 a 8,3 afetando negativamente em alguns cultivos o crescimento celular e acelerando a degradação do ácido clavulânico. A literatura mostra que valores de pH entre 6,2 e 7,0, o ácido clavulânico apresenta maior estabilidade (Bersanetti *et al.*, 2005). Uma possível explicação para elevados valores de pH é que o microrganismo começa a consumir os aminoácidos da proteína da farinha de soja presente no meio liberando amônia via ciclo da uréia e elevando assim o pH do caldo. Apesar dos altos valores de pH detectados em alguns cultivos, foram obtidas altas quantidades de AC quando utilizados os criotubos CNL 2-10; CL 2-20 e CNL 1-20.

Os baixos valores de K, índice de consistência do caldo, medidos no final do cultivo (144 horas) indicam a baixa viscosidade dos caldos que, em alguns casos correspondem a baixas concentrações celulares, provavelmente pela exaustão de nutrientes ou mesmo pela lise celular. No entanto, foram observadas altas produções de AC, o que significa que tais condições de preservação propiciaram altas produções mesmo com baixas concentrações celulares, ou seja, alta produção específica. Isto pode se atribuído, provavelmente a uma condição de “stress” a qual o microrganismo foi submetido, devido a fatores como alto pH e exaustão de nutrientes. Já o índice de comportamento de escoamento (n) variou entre 0,17 e 1,11. Valores de n próximos de 1,00 indicam um fluido com características reológicas Newtonianas, indicando novamente a ocorrência de morte celular.

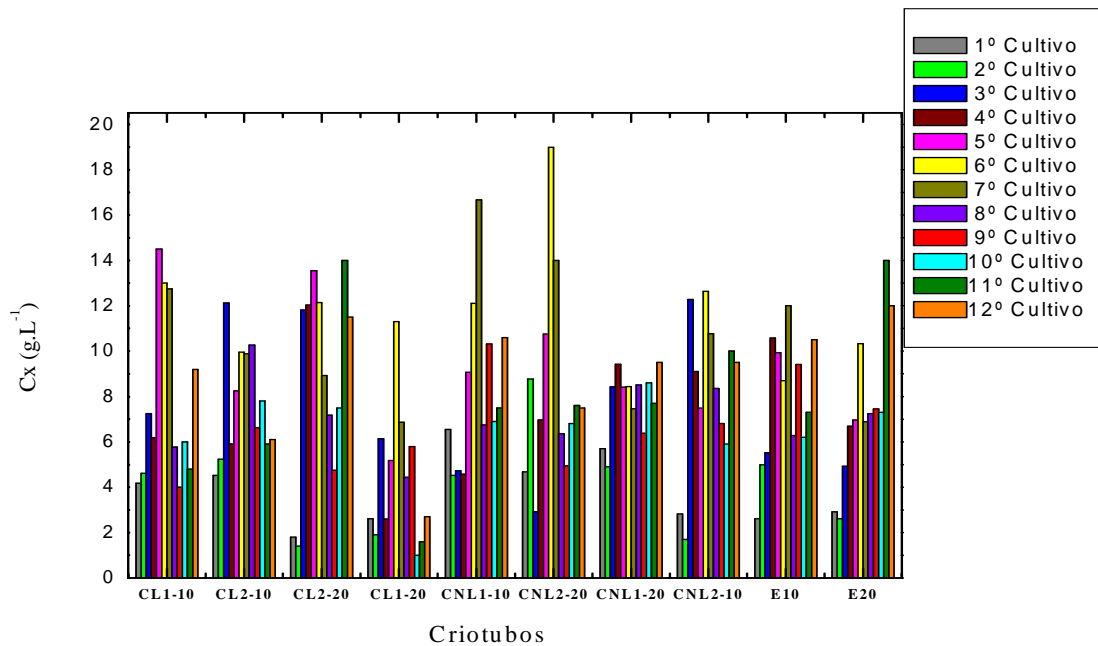
Para avaliar a influência da forma de preservação no crescimento celular, foram obtidos valores de concentração celular ao final das etapas de reativação e no momento final dos cultivos (144 horas). As Figuras 4.1 e 4.2 mostram os valores de concentração celular (Cx) obtidos pelo método da massa seca, logo após a reativação do criotubo e a concentração celular no tempo de 144 horas, obtida através da correlação proposta por Baptista-Neto (2004).

$$Cx = 3,76 \cdot K^{0,333} \cdot n^{0,079} \quad (2.2)$$



**Figura 4.1. Concentração celular ao final da etapa de reativação para as diversas condições de preservação.**

Analisando-se os gráficos das Figuras 4.1 e 4.2, observa-se que o 1º, 2º e 3º cultivos tiveram valores de Cx menores em relação a outros cultivos, como por exemplo, os cultivos 9º, 10º, 11º e 12º, tanto no início do ensaio como no final de 144 horas mas, no entanto, com altos valores de AC. Uma possível explicação é que nesses criotubos poderiam ter poucas células, mas células viáveis com alta capacidade de produção de AC. Os criotubos armazenados há 270 dias ou mais em ultrafreezer tiveram valores altos de Cx, mas produziram pouco AC como já era esperado, devido provavelmente ao fato desses criotubos terem poucas células viáveis.



**Figura 4.2. Concentração celular em 144 horas de cultivo obtida a partir dos parâmetros reológicos K e n**

Observa-se claramente através dos gráficos das Figuras anteriores que houve uma grande variabilidade entre os valores de concentração celular para as diversas condições de preservação empregadas e nos 12 cultivos realizados, não sendo possível relacionar o crescimento celular com a produção de AC e com as condições de preservação. O que se deve ressaltar com base nesses resultados é que, independente da condição de preservação empregada, os microrganismos cresceram ao longo dos cultivos e apresentaram capacidade de produzir AC.

A média comparativa dos resultados em termos de produção de ácido clavulânico utilizando criotubos de células de *S. clavuligerus* conservadas em diferentes condições ao do tempo de preservação encontra-se, respectivamente, nas Figuras 4.3 a 4.14.

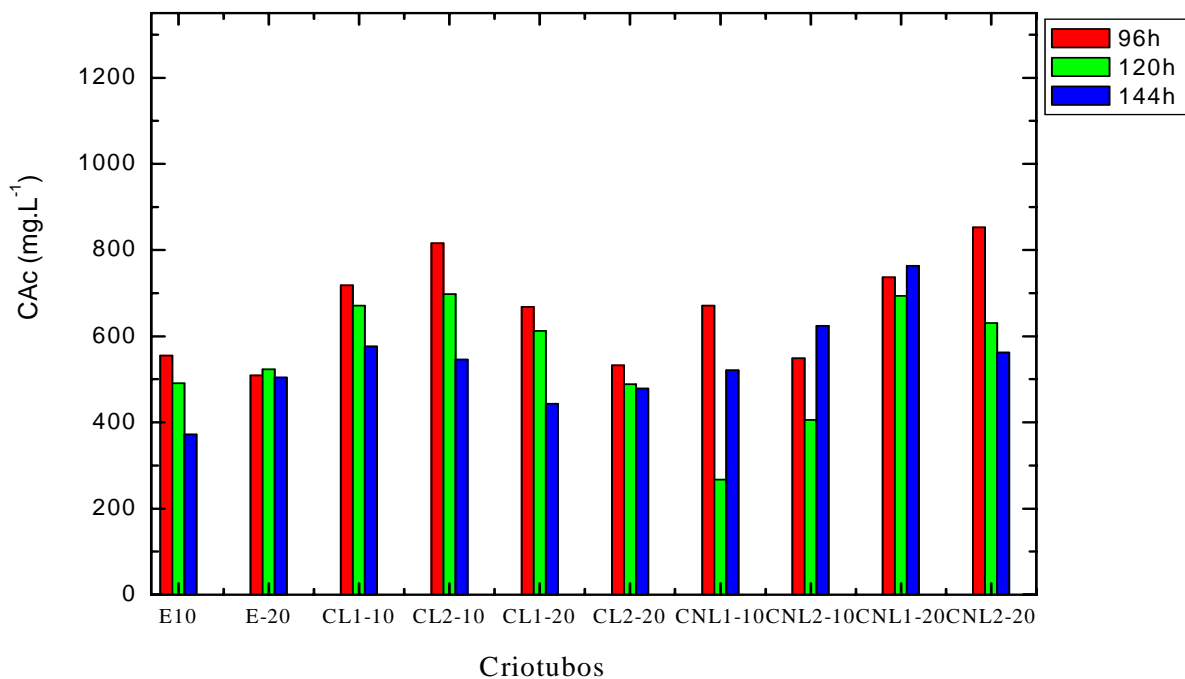


Figura 4.3. Produção de ácido clavulânico após 30 dias de armazenamento

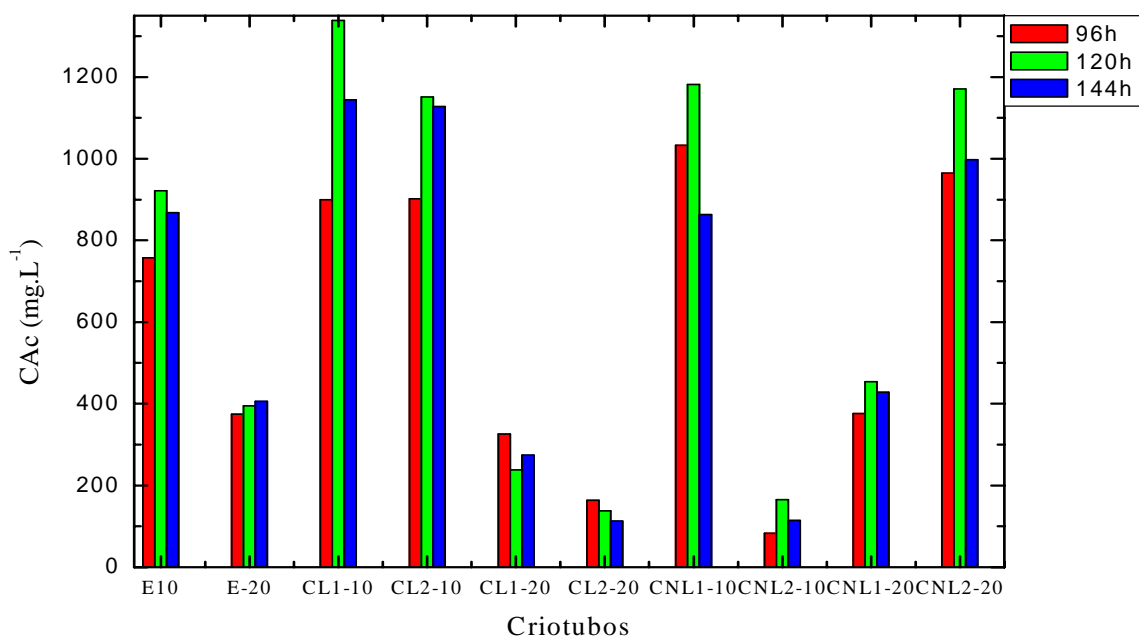


Figura 4.4. Produção de ácido clavulânico após 60 dias de armazenamento

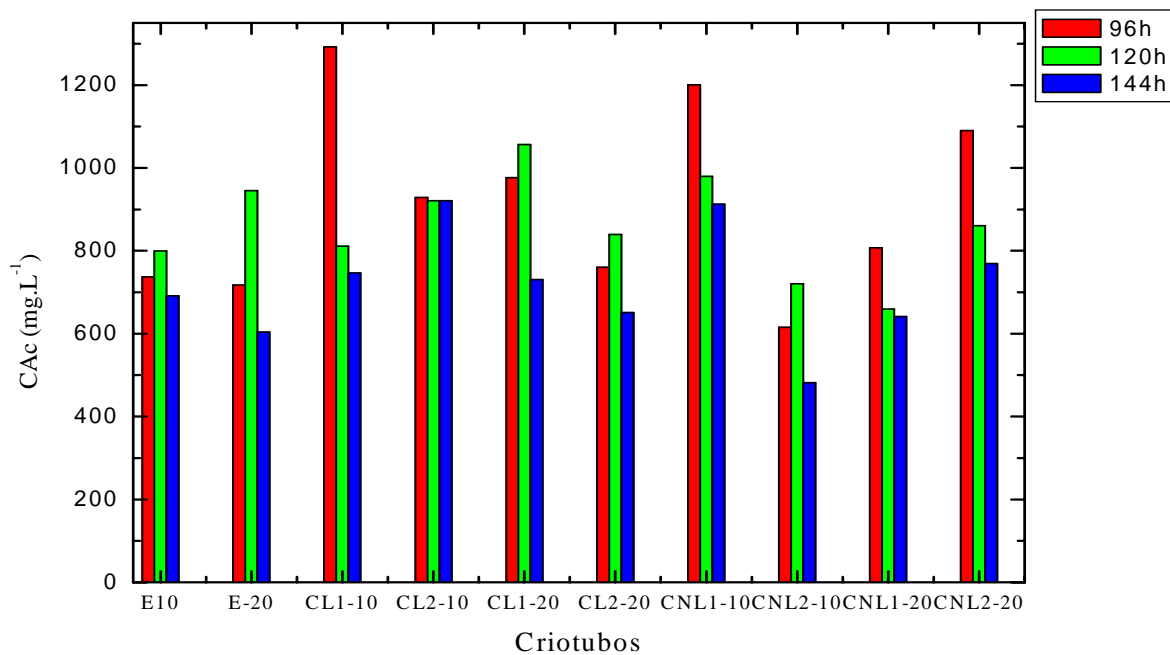


Figura 4.5. Produção de ácido clavulânico após 90 dias de armazenamento

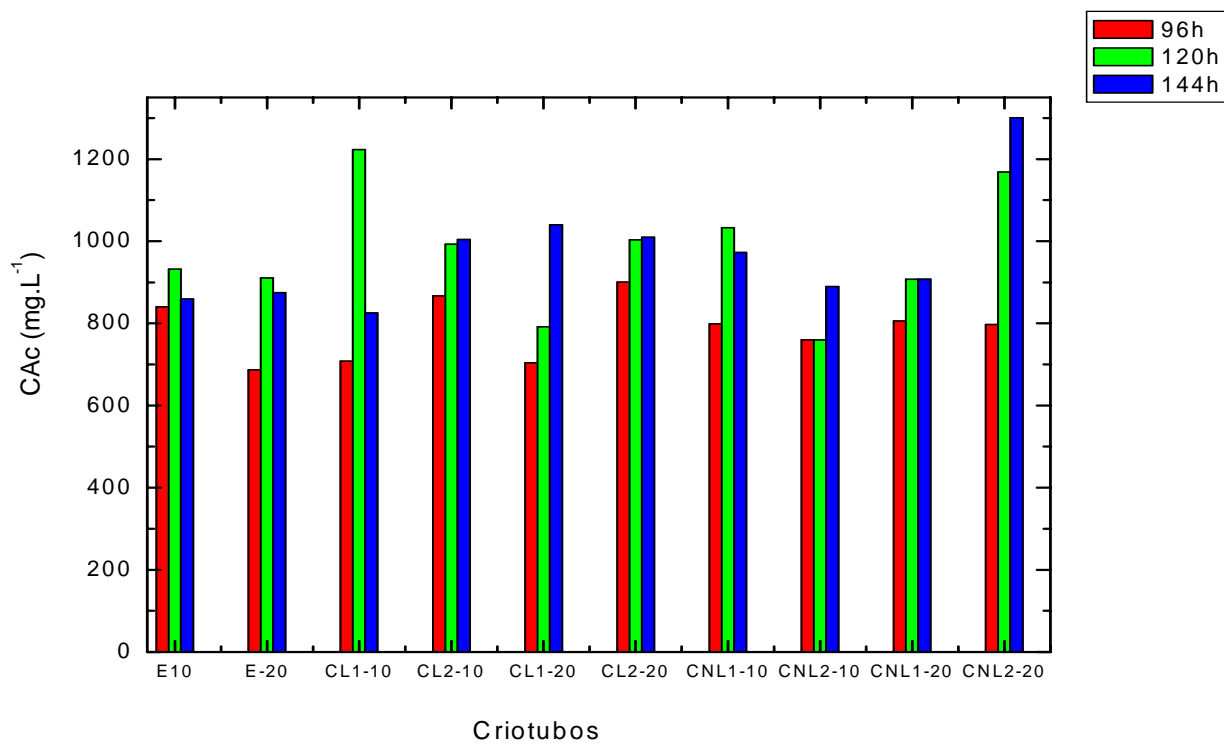


Figura 4.6. Produção de ácido clavulânico após 120 dias de armazenamento

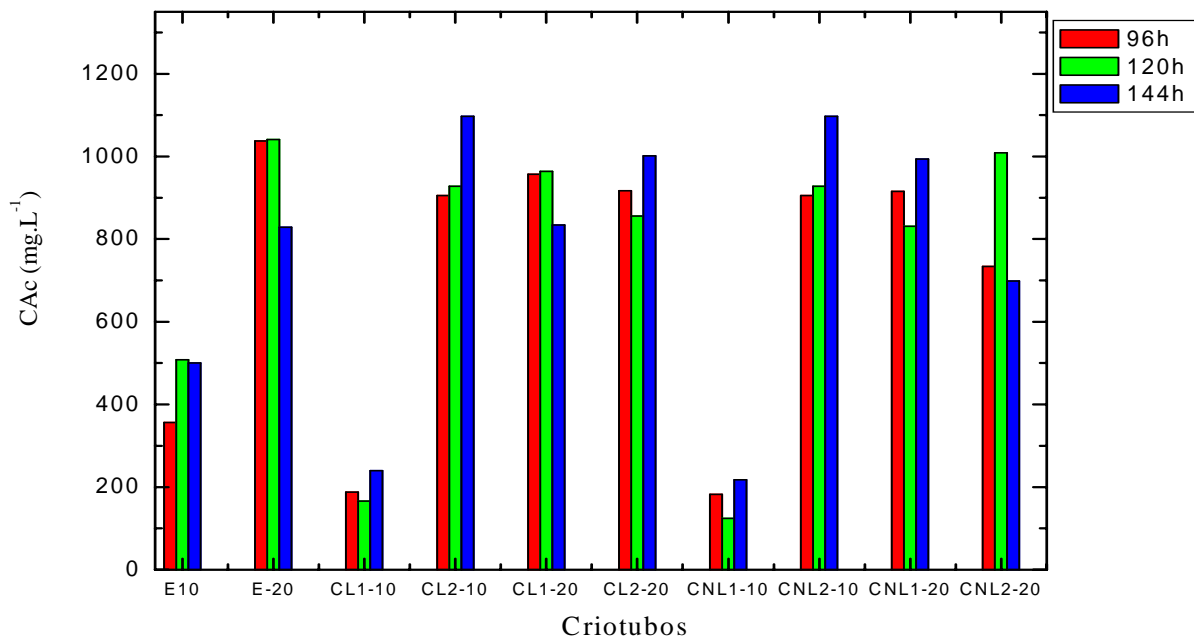


Figura 4.7. Produção de ácido clavulânico após 150 dias de armazenamento

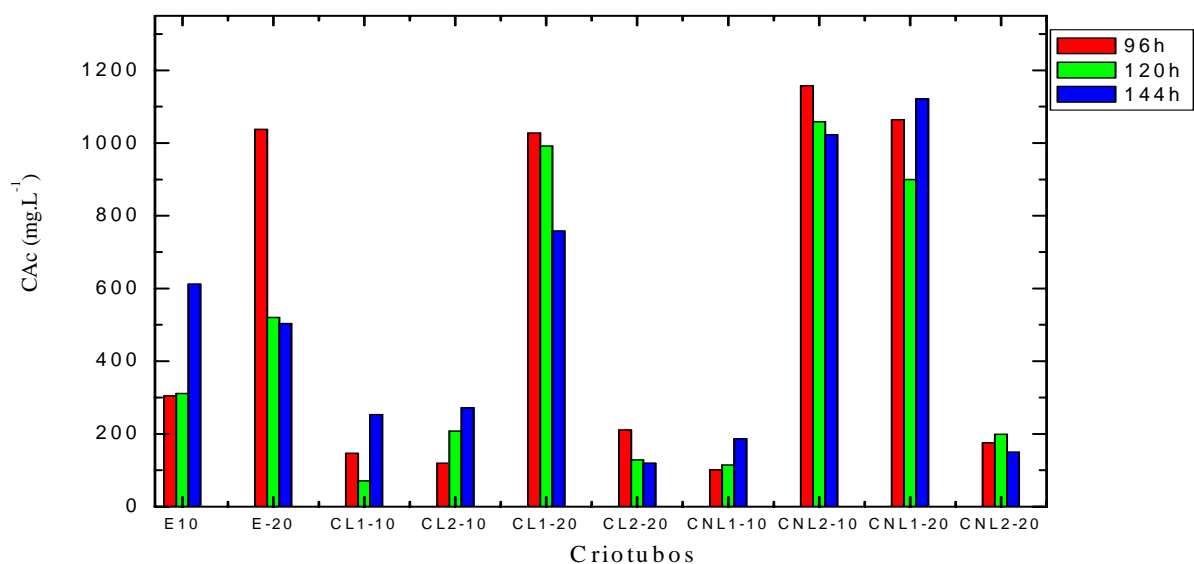


Figura 4.8. Produção de ácido clavulânico após 180 dias de armazenamento



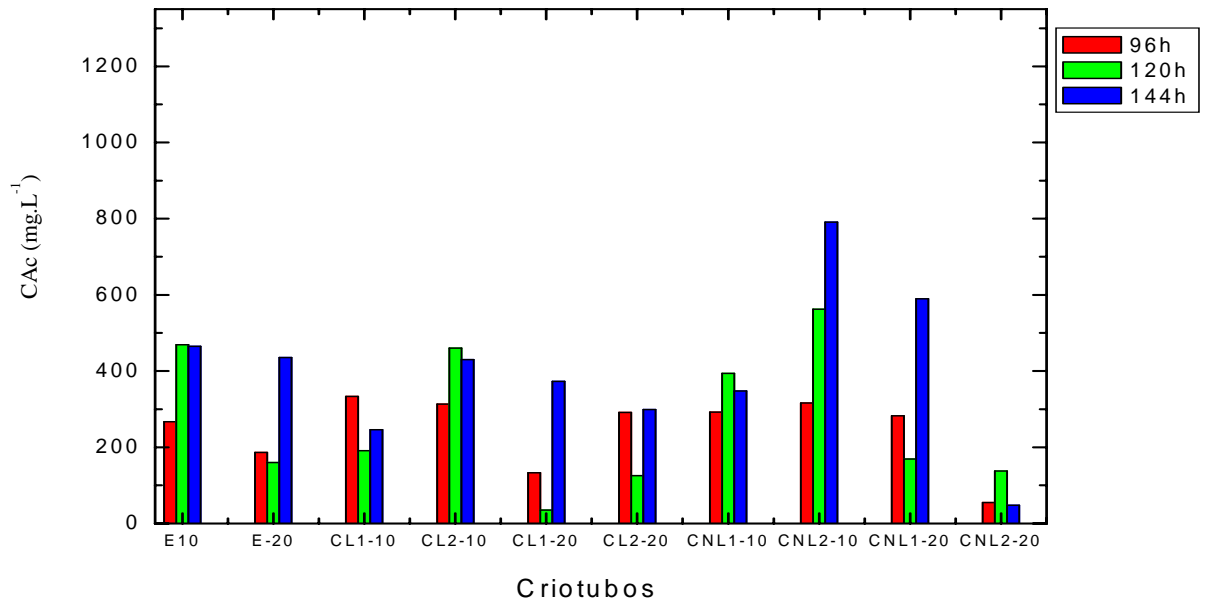


Figura 4.9. Produção de ácido clavulânico após 210 dias de armazenamento

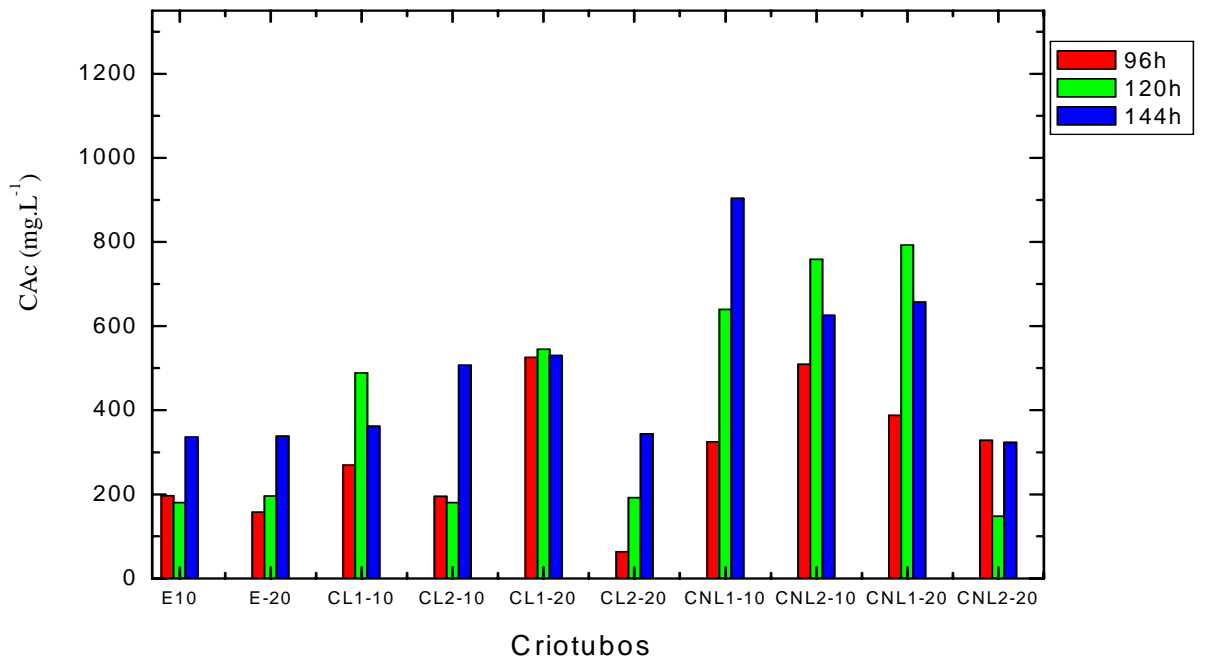


Figura 4.10. Produção de ácido clavulânico após 240 dias de armazenamento

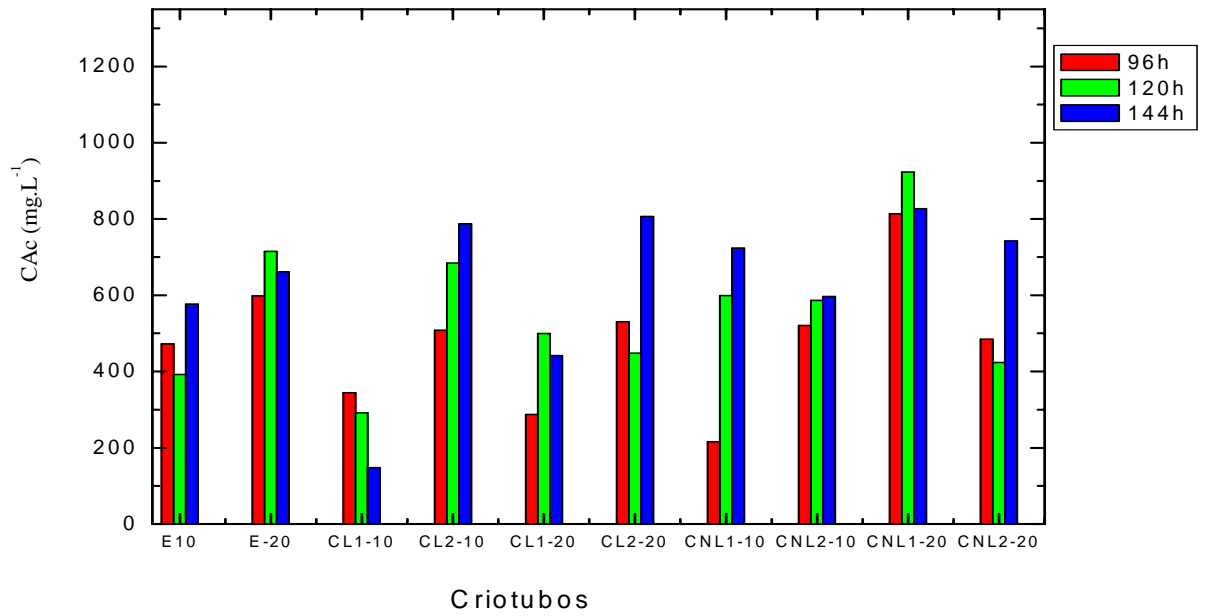


Figura 4.11. Produção de ácido clavulânico após 270 dias de armazenamento

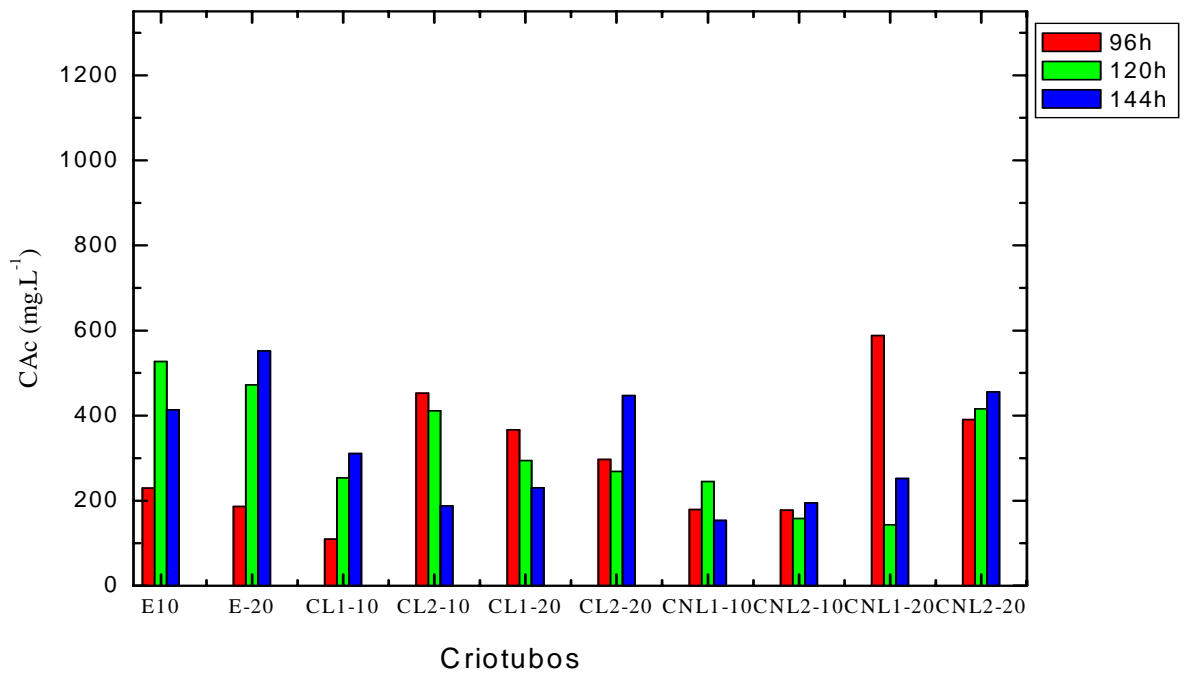


Fig.4.12. Produção de ácido clavulânico após 300 dias de armazenamento

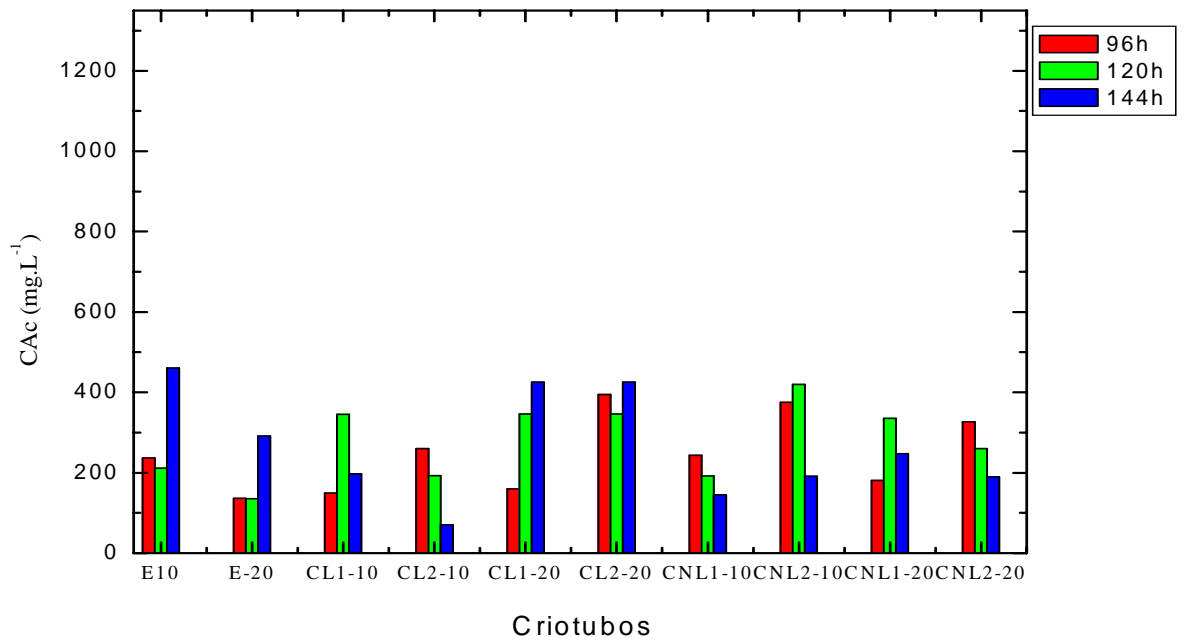


Figura 4.13. Produção de ácido clavulânico após 330 dias de armazenamento

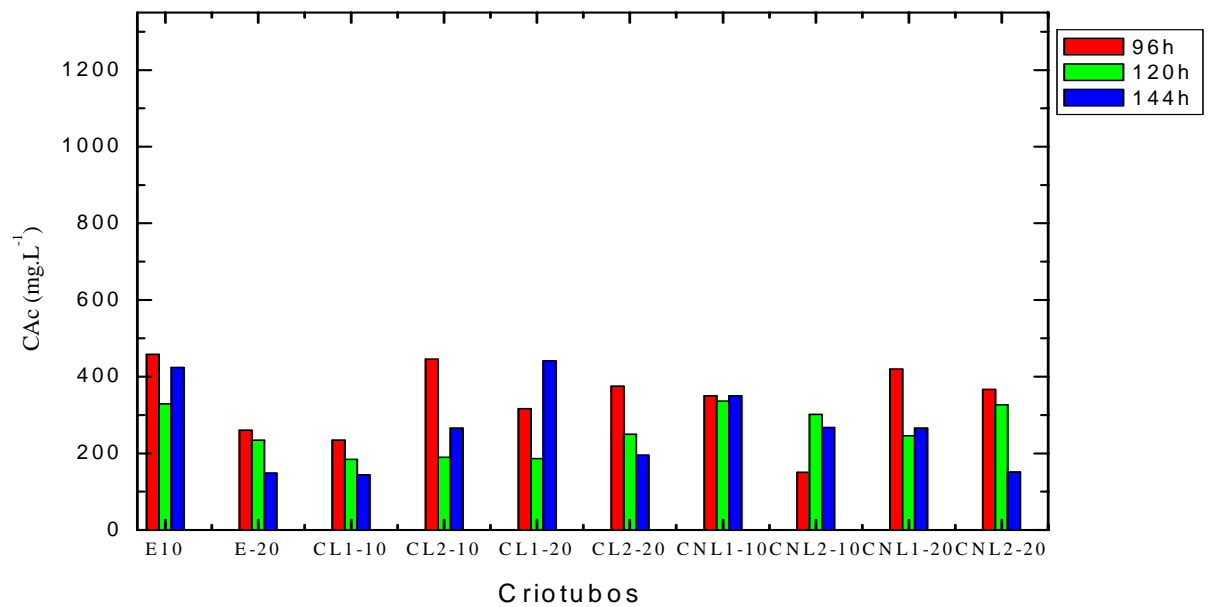
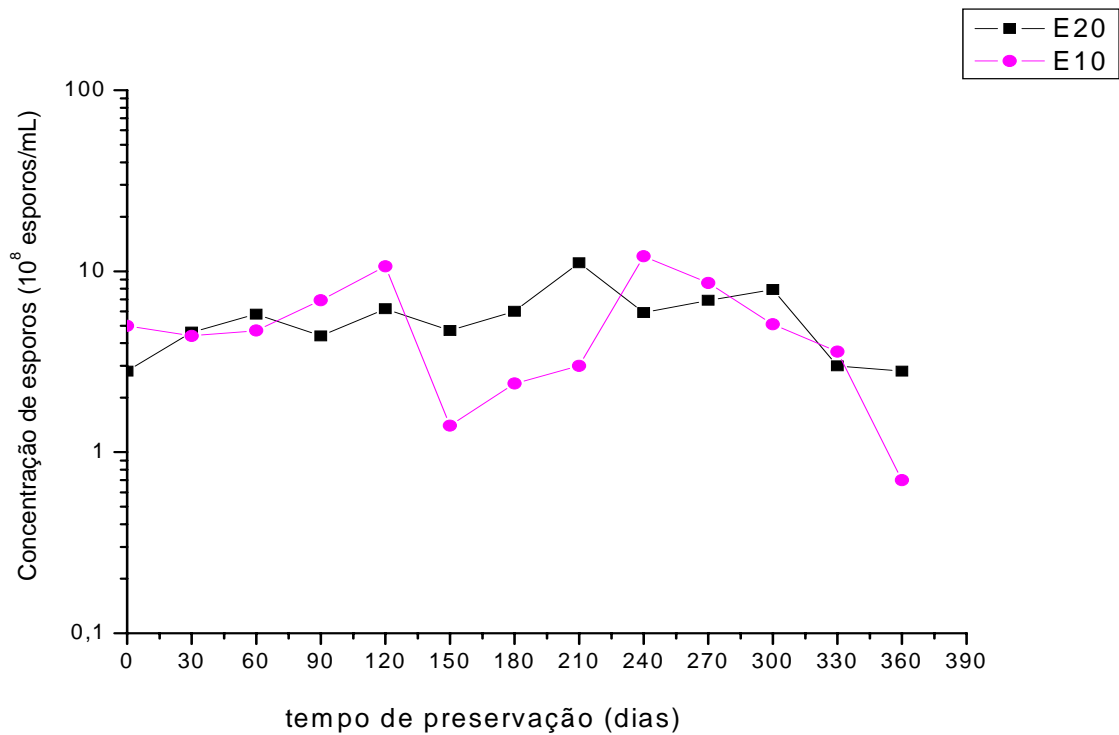


Figura 4.14. Produção de ácido clavulânico após 360 dias de armazenamento

Com relação à viabilidade celular, as mesmas mantiveram-se praticamente constantes nos dois conjuntos de criotubos com esporos (Tabela 4.13 e Figura 4.15). Pode-se observar que houve uma variabilidade entre os ensaios que pode ter sido influenciada pelas quantidades diferentes de células nos criotubos do mesmo lote, no momento da transferência dos esporos para os criotubo. Uma vez que se trata de uma suspensão, a homogeneização pode não ter sido perfeita. No entanto, deve-se salientar que não se observou queda de viabilidade nos criotubos com esporos.

**Tabela 4.13. Resultados da viabilidade dos conjuntos de criotubos de esporos dos ensaios.**

Ensaio	Viabilidade (UFC.mL <sup>-1</sup> )	
	E-10	E-20
0	5,0 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>
1	4,4 x 10 <sup>8</sup>	4,6 x 10 <sup>8</sup>
2	4,7 x 10 <sup>8</sup>	5,8 x 10 <sup>8</sup>
3	6,9 x 10 <sup>8</sup>	4,4 x 10 <sup>8</sup>
4	1,0 x 10 <sup>9</sup>	6,2 x 10 <sup>8</sup>
5	1,4 x 10 <sup>8</sup>	4,7 x 10 <sup>8</sup>
6	2,4 x 10 <sup>8</sup>	6,0 x 10 <sup>8</sup>
7	3,0 x 10 <sup>8</sup>	1,1 x 10 <sup>9</sup>
8	1,2 x 10 <sup>9</sup>	5,9 x 10 <sup>8</sup>
9	8,6 x 10 <sup>8</sup>	6,9 x 10 <sup>8</sup>
10	5,1 x 10 <sup>8</sup>	7,9 x 10 <sup>8</sup>
11	3,6 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>
12	7,0 x 10 <sup>7</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>



**Figura 4.15. Concentração de esporos no decorrer de 360 dias.**

Através do teste estatístico de análise de variância (ANOVA), verificou-se que não houve diferença significativa entre as médias dos diferentes conjuntos de criotubos. Avaliando os resultados obtidos no gráfico da Figura 4.15, pode-se tirar algumas conclusões em relação à estabilidade da produção de AC nos diferentes formas de preservação de esporos, perda em porcentagem (%) da produção de AC depois de 360 dias em relação ao valor inicial e o tempo da queda da produção de AC.

As análises foram realizadas primeiramente avaliando as influências das 3 variáveis na preservação do microrganismo separadamente.

#### **4.1 Influência dos números de etapa de crescimento na preservação**

A Tabela 4.14 apresenta os valores de perda em porcentagem da capacidade produtiva de AC ao final de 360 dias em relação à produção inicial (30 dias).

**Tabela 4.14. Perda da capacidade produtiva de AC.**

<b>Código do Criotubo</b>	<b>Valor inicial de Produção (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor final de produção (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Perda da produção (%)</b>
E-10	558,8	458,4	18
E-20	523,4	259,9	50
CL1-10	718,9	234,5	67
CL1-20	667,7	440,7	34
CL2-10	816,2	445,7	45
CL2-20	532,6	375,3	30
CNL1-10	672,0	349,9	48
CNL1-20	763,4	419,9	45
CNL2-10	624,3	301,5	52
CNL2-20	854,0	366,0	57

Nos gráficos das Figuras 4.16 e 4.17 observa-se uma queda brusca na produção de AC após o 4º mês para a forma de preservação CL1-10. Após esse período, a produção permaneceu muito baixa e estável, havendo uma queda de 67% da produção em relação ao primeiro mês. Na forma de preservação CL2-10, a queda da produção após o 4º mês de armazenamento foi de 45% da produção em relação ao primeiro mês (vide Tabela 4.14), ocorrendo muitas oscilações ao longo do tempo em comparação com CL1-10, que apresentou melhor estabilidade (menor oscilação).

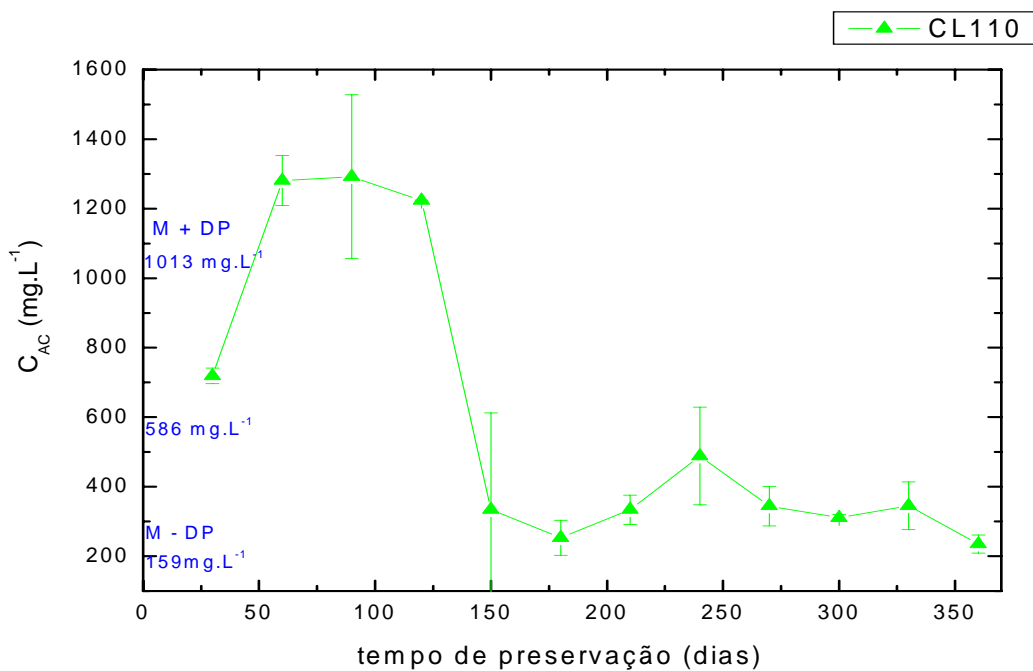


Figura 4.16. Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL1-10.

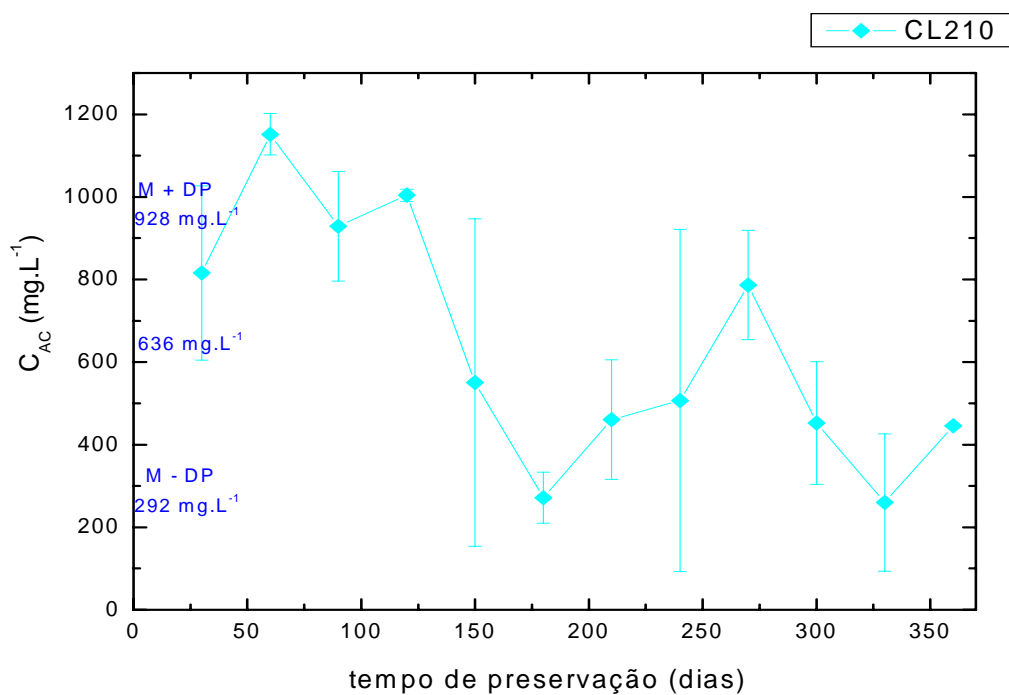
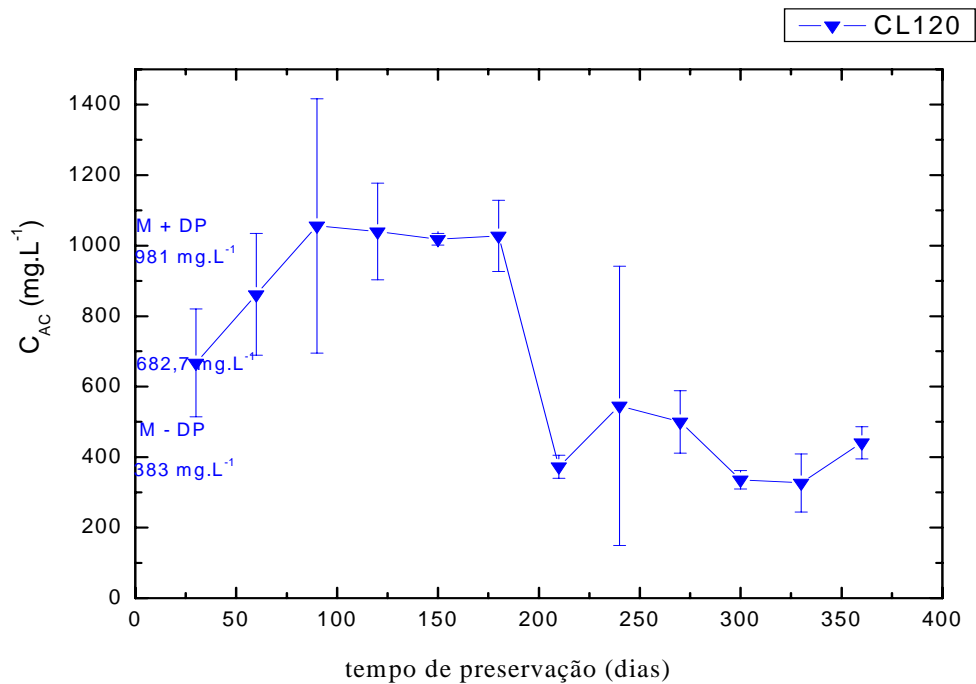


Figura 4.17. Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL2-10.

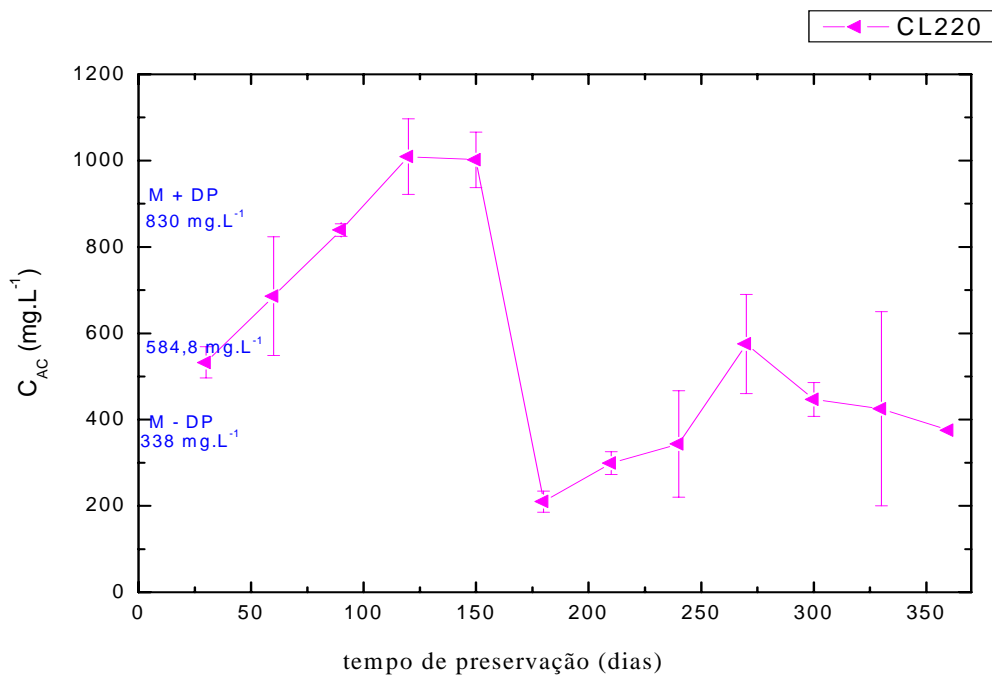
Ainda em relação à influência da etapa de crescimento, comparando os modos de preservação CL1-20 e CL 2-20 (Figuras 4.18 e 4.19) pode-se observar que houve uma queda na produção após o 6º mês de armazenamento para a forma de preservação CL1-20.

Para CL2-20 observa-se uma queda brusca na produção após o 5º mês e um aumento novamente da produção 9º mês, o que pode ser explicado pelas diferenças entre as quantidades de células presentes nesses criotubos como também à influência do pH no crescimento celular e na degradação do produto. Após isso, a produção voltou a cair até o 12º mês. A perda na produção de AC em relação ao primeiro mês de cultivo nos criotubos CL1-20 (34%) foi um pouco maior que nos CL2-20 (30%). Os criotubos CL1-20 apresentaram uma curva de estabilidade melhor que a dos CL2-20.



**Figura 4.18. Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL1-20.**





**Figura 4.19. Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL2-20.**

Nos gráficos das Figuras 4.20 e 4.21 pode-se observar que para os criotubos CNL1-10 houve uma queda brusca da produção após o 4º mês de armazenamento, seguida de um aumento da produção no 8º mês. Após isso a produção voltou a cair até o 11º mês, com um pequeno aumento no último mês. Nos CNL2-10, a queda na produção ocorreu após os seis meses (180 dias) de armazenamento. As perdas de produção de AC em relação ao primeiro mês foram próximas para os criotubos CNL1-10 (48%) e CNL2-10 (52%). Os criotubos CNL 2-10 tiveram uma curva de estabilidade melhor do a dos CNL1-10.

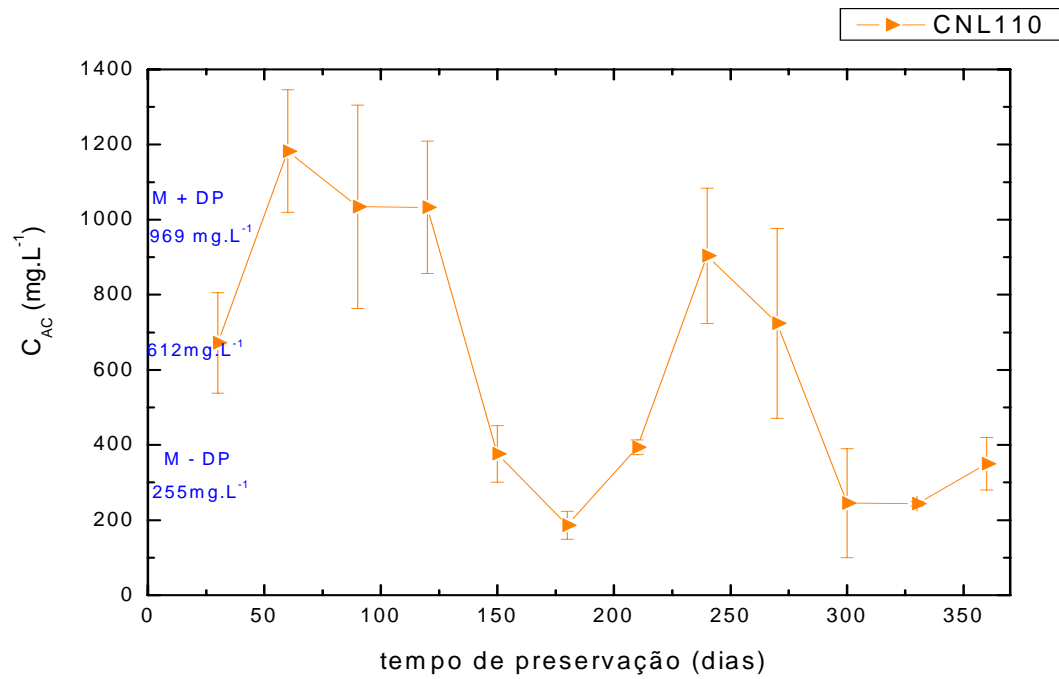


Figura 4.20. Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-10.

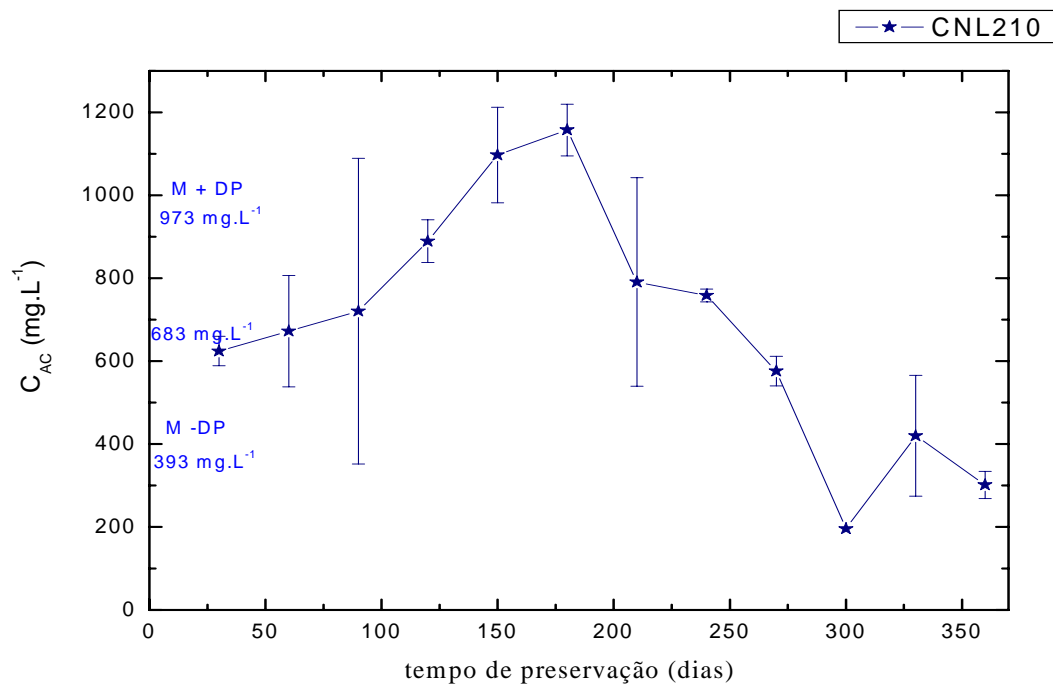
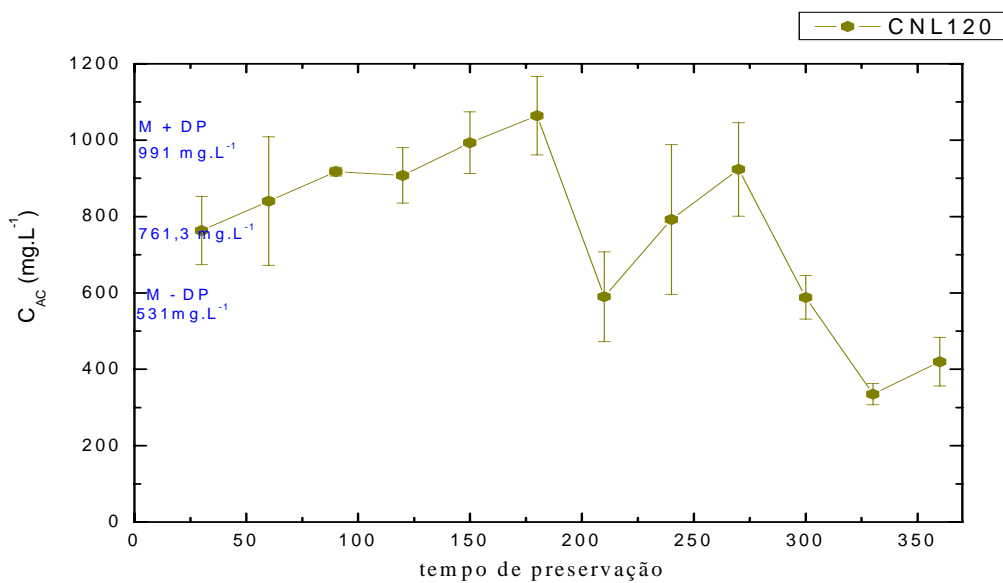
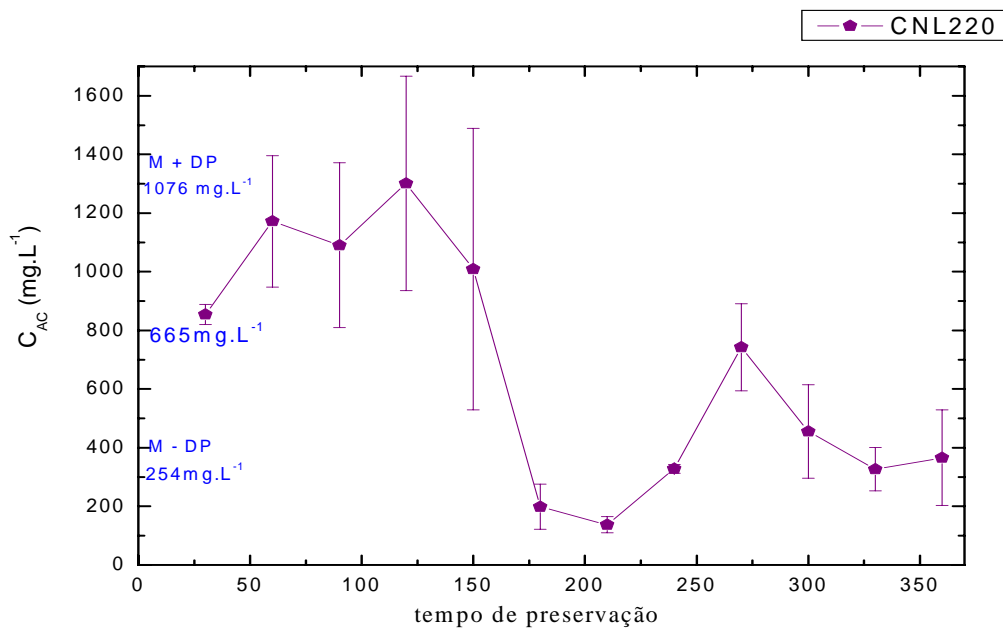


Figura 4.21. Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL2-10.

Em relação aos modos de preservação CNL1-20 e CNL2-20 (Figuras 4.22 e 4.23) pode-se concluir que a queda na produção do CNL1-20 ocorreu após 180 dias de armazenamento, mas houve um aumento novamente da produção no 8º mês, o que pode novamente ser explicado pelas diferenças entre as quantidades de células presentes nesses criotubos como também à influência do pH no crescimento celular e na degradação do produto. Após esse período a produção voltou a cair até o 11º mês, com um pequeno aumento no último mês. A perda na produção de AC em relação ao primeiro mês de cultivo nos criotubos CNL 2-20 de 48% foi inferior à dos criotubos CNL1-20 (57%).



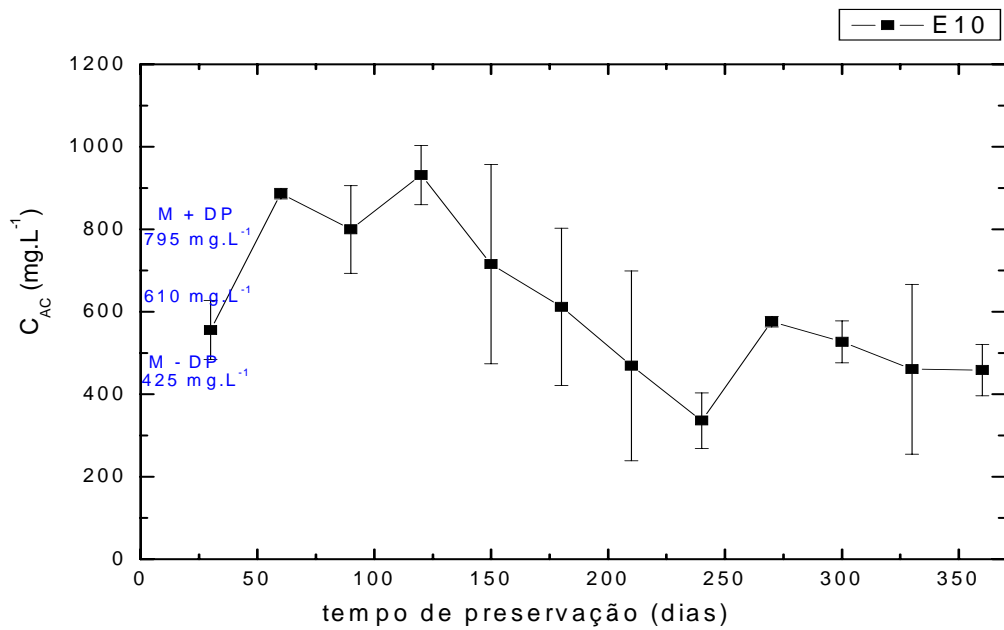
**Figura 4.22. Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-20.**



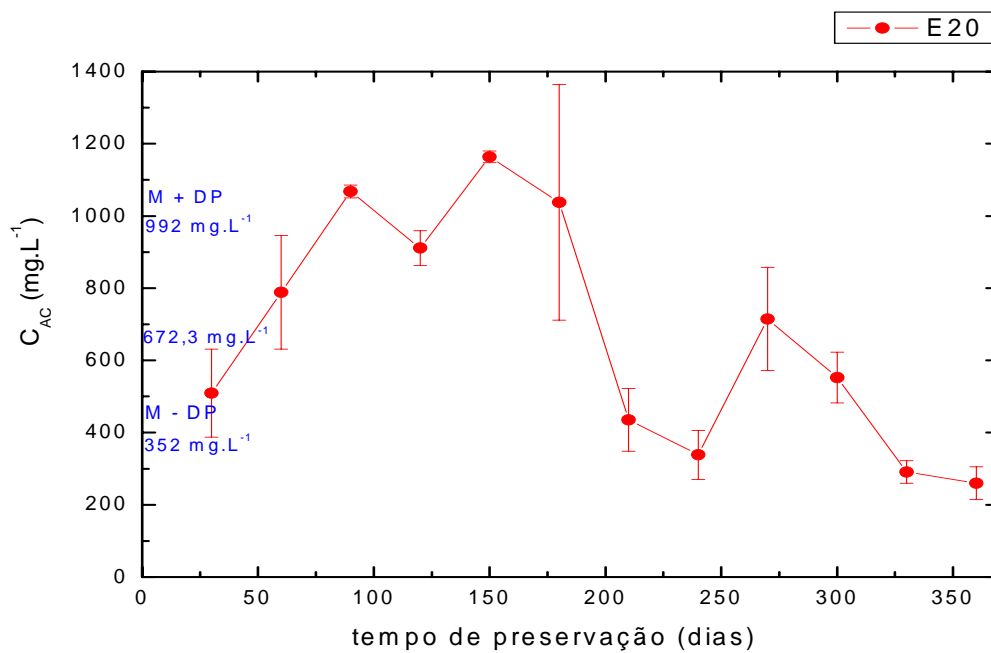
**Figura 4.23. Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL2-20.**

#### 4.2. Influência da concentração do agente crioprotetor (glicerol 10 ou 20% v/v)

O lote de criotubos E-10 apresentou uma queda na produção a partir do 4º mês (120 dias) de armazenamento. Entre o 8º e o 9º mês, observou-se um novo aumento da produção de AC, voltando a cair do 9º até o 12º mês. Observou-se uma pequena perda de produção de AC de 18% em relação ao primeiro mês de cultivo nos criotubos, menor valor entre todos os lotes de criotubos. Já o lote de criotubos E-20 teve uma queda na produção a partir do 6º mês (180 dias) de armazenamento, o que pode estar associado à concentração do agente crioprotetor. Observou-se uma perda na produção de AC de 50% após de 1 ano de armazenamento. Ainda, pôde-se observar que o lote E-10 apresentou uma melhor estabilidade que o lote E-20.



**Figura 4.24.** Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação E-10.



**Figura 4.25.** Produção máxima de ácido clavulânico obtida ao longo de 360 dias para a forma de preservação E-20.

Há uma série de fatores que podem influenciar a viabilidade de uma linhagem. Um deles poderia ser o estado fisiológico da cultura (célula vegetativa ou esporos) submetida

à criopreservação ou liofilização. Foi demonstrado que esporos de *Streptomyces* são mais resistentes a variações de temperatura do que células vegetativas (Kusnetsov e Bushueva, 1973). A forma de preservação de esporos com 10% de glicerol foi a que teve menor perda na produção durante 360 dias, podemos afirmar que armazenar esporos com 10% de glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$  é melhor que com 20% de glicerol em relação a viabilidade.

A queda da produção dos criotubos do lote CL1-20 foi mais lenta que a do CL1-10, o que pode ser explicado pela maior concentração de glicerol como agente crioprotetor. O lote CL1-20 apresentou queda na produção após o 6º mês, já o lote CL1-10 apresentou queda após 4º mês de armazenamento. Após 1 ano de armazenamento, os criotubos do lote CL1-20 apresentaram perda da produção de 34%, bem inferior quando comparada à do lote CL 1-10 de 67%.

A queda da produção do lote CL2-20 foi mais lenta que a do lote CL2-10, o que pode ser explicado novamente pela maior concentração de glicerol como agente crioprotetor. Os criotubos do lote CL2-20 apresentaram queda na produção após o 5º mês. Já para os criotubos do lote CL2-10 a queda foi após 4º mês de armazenamento. A perda da produção após 1 ano para o lote de CL2-20 foi de 30%, bem inferior quando comparada à do lote CL2-10 de 45%.

Quanto aos lotes de criotubos com células vegetativas não lavadas (CNL), a queda da produção do lote CNL1-20 foi mais lenta que a do lote CNL1-10, o que pode ser explicado novamente pela maior concentração de glicerol como agente crioprotetor. O lote CNL1-20 apresentou queda na produção após do 6º mês, já o lote CNL1-10 apresentou queda da produção de AC após 4º mês de armazenamento. As perdas de produção de AC em relação ao primeiro mês foram próximas para os criotubos CNL1-20 (45%) e CNL 1-10 (48%). A curva de produção dos criotubos do lote CNL1-20 mostrou-se mais estável que a do lote CNL1-10.

A queda da produção de CNL2-10, diferentemente dos outros conjuntos com 10% v/v de agente crioprotetor (glicerol), foi mais lenta do que CNL2-20. Os criotubos do lote CNL2-10 apresentaram queda na produção de AC após do 6º mês. Para os criotubos do lote CNL2-20 a queda foi após 4º mês de armazenamento. As perdas de produção de AC após o tempo de preservação de 1 ano foram próximas para os criotubos CNL2-10 (52%) e CNL 2-20 (57%).

Os crioprotetores diminuem o ponto de congelamento do sistema e reduzem a quantidade e o tamanho dos cristais de gelo durante o esfriamento, contribuindo para a

proteção física das membranas e impedindo o aumento da concentração do produto iônico do congelamento da água (Gherna, 1981).

Nos conjuntos de criotubos com uma etapa de crescimento e com lavagem das células a perda na produção de AC no final de um ano foi maior em relação valor inicial. Com duas etapas sem lavagem a perda foi maior, sendo aqui observada a influência conjunta da lavagem das células e da etapa de crescimento. Uma etapa de crescimento com 10% v/v de glicerol apresentou uma média de produção de AC menor com ou sem lavagem das células. Com 20% v/v de glicerol a média foi maior. Constatase, portanto, a influência do agente crioprotetor na média de produção.

#### **4.3. Influência da Lavagem das Células**

A curva de produção dos criotubos do lote CL1-10 foi mais estável que a do lote CNL1-10, embora a perda da produção no final de 12 meses tenha sido maior (67%) em relação à do lote CNL1-10, de 48%.

Os criotubos do lote CL2-10 tiveram muitas oscilações na produção durante os 12 meses de armazenamento. A curva de produção relativa ao lote CNL2-10 foi mais estável do que a do lote CL 2-10 e a perda da produção dos criotubos do lote CL2-10 foi menor (45%) em relação à do lote CNL2-10, de 52%.

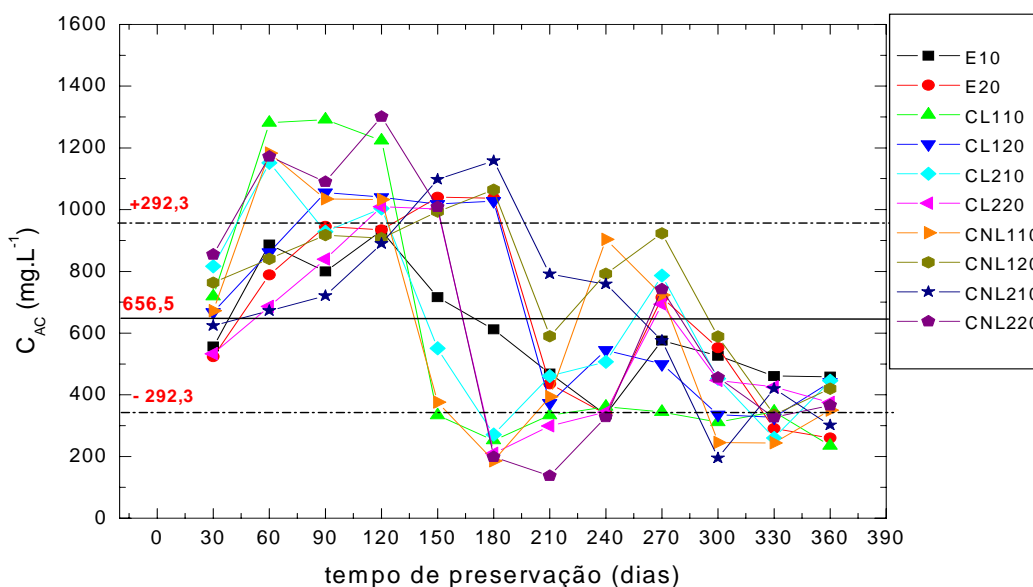
Comparando os criotubos dos lotes CL2-20 e CNL2-20, pode-se notar que a curva de produção do lote CNL2-20 apresentou algumas oscilações no início e apresentou comportamento bem semelhante ao do lote CL2-20. A perda de produção dos criotubos do lote CL2-20 foi de 30% e do lote CNL 2-20 foi de 57%.

Comparando os comportamentos dos criotubos dos lotes CL1-20 e CNL1-20, pode-se notar que as curvas de produção foram bem semelhantes. A perda de produção do lote CL1-20 foi de 34% e do lote CNL1-20 foi de 45%.

Com exceção do CL1-10, todos os conjuntos de criotubos com lavagem de células apresentaram uma perda menor no final de 1 ano em relação aos criotubos de células não lavadas. Não houve muita diferença entre as curvas de produção em relação à estabilidade dos criotubos, ou seja, todos apresentaram flutuação na produção.

Quanto à estabilidade dos criotubos, pode-se notar que houve certa variabilidade entre cultivos que pode ter sido influenciada por outros fatores como quantidades diferentes de células nos criotubos do mesmo lote e a variação de pH ao longo

dos cultivos. Pode-se observar esta estabilidade na Figura 4.26, que mostra os perfis da concentração de ácido clavulânico durante os 12 meses de preservação, para as diferentes formas de preservação. Os valores utilizados no gráfico correspondem à média da triplicata correspondente ao valor máximo de produção, independentemente do tempo de cultivo (96, 120 ou 144 h), uma vez que o pico de produção pode ocorrer nesses diferentes tempos de cultivo. Para a análise de estabilidade do criotubos foi gerada uma grande média com o respectivo desvio padrão, utilizando todos os valores correspondentes ao valor máximo de produção, calculado como sendo  $656,5 \pm 292,3$  mg.L<sup>-1</sup>. Observa-se no gráfico da Figura 4.26 quais conjuntos de criotubos ou formas de preservação estão dentro do desvio padrão, ou seja, mantendo certa estabilidade.



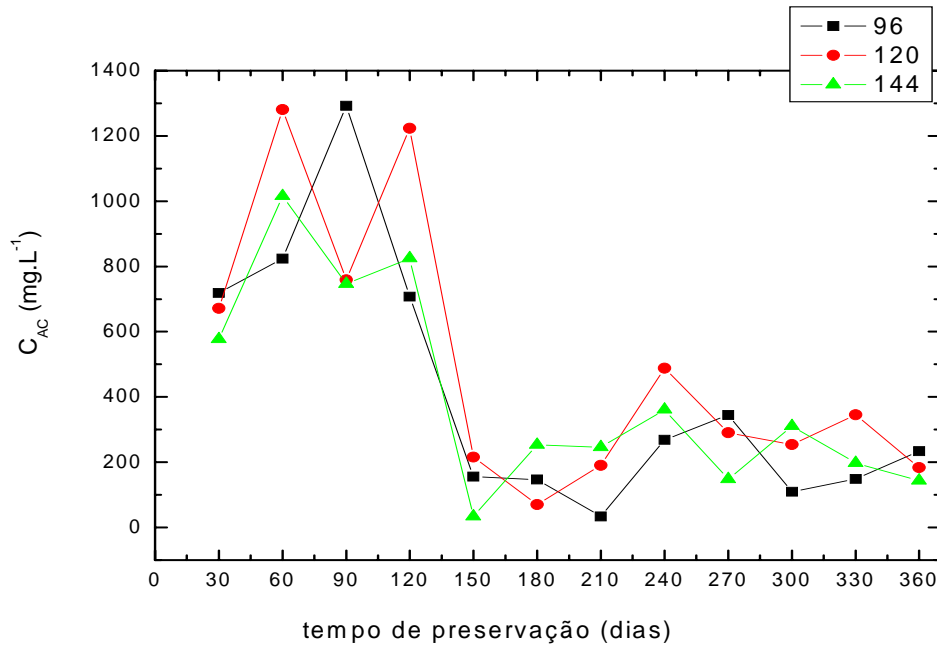
**Figura 4.26. Produções de ácido clavulânico ao longo de 360 dias obtidas para as diferentes formas de preservação.**

Em relação às produções de AC obtidas, o valor máximo alcançado foi de  $1300$  mg.L<sup>-1</sup> em 144 h, no modo de preservação CNL 2-20. Esse resultado é o melhor obtido até o momento na literatura consultada, em cultivos em mesa incubadora rotativa com meio complexo e linhagem selvagem, acima da produção encontrada por Wang *et al.* (2005), de  $670$  mg.L<sup>-1</sup> em cultivo com a adição do aminoácido ornitina e de Maranesi *et al.* (2005) de  $721,9$  mg.L<sup>-1</sup> de AC em 120 horas de cultivo utilizando o mesmo meio de cultura de produção do presente trabalho.

As Figuras 4.27 a 4.36 ilustram os perfis das médias das triplicatas de cada amostra em relação à produção de AC nos diferentes tempos de cultivo, para os 10 lotes de



criotubos ao longo de 360 dias de preservação. Observa-se que os picos de produção de AC ocorreram aleatoriamente em 96, 120 e 144 horas de cultivo, bem como que não houve, na maioria dos cultivos, grande diferença entre os valores dos picos, independente do tempo de cultivo.



**Figura 4.27.** Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL1-10.

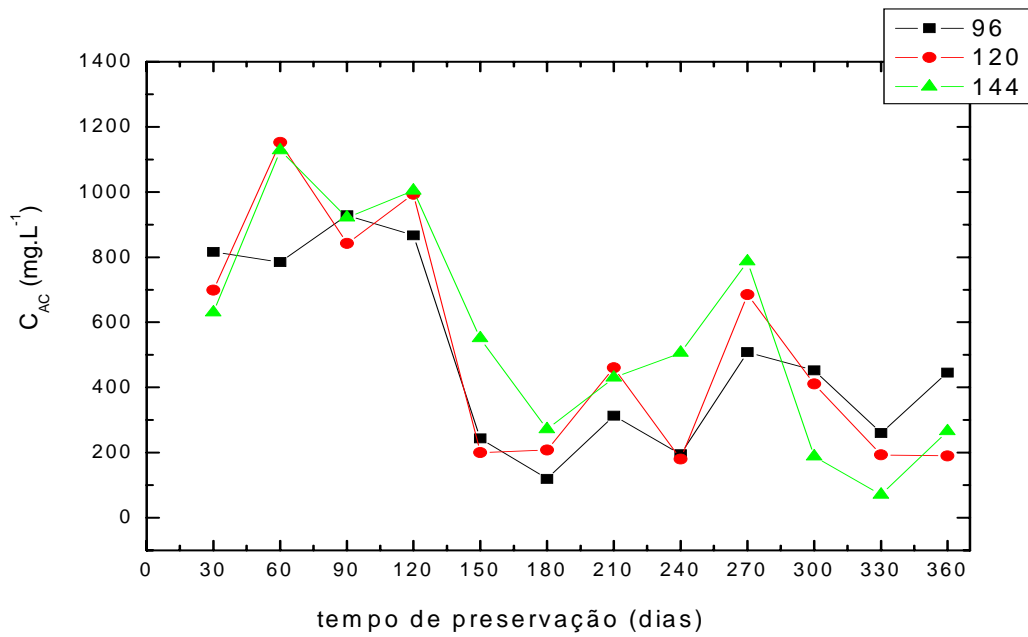


Figura 4.28. Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL2-10.

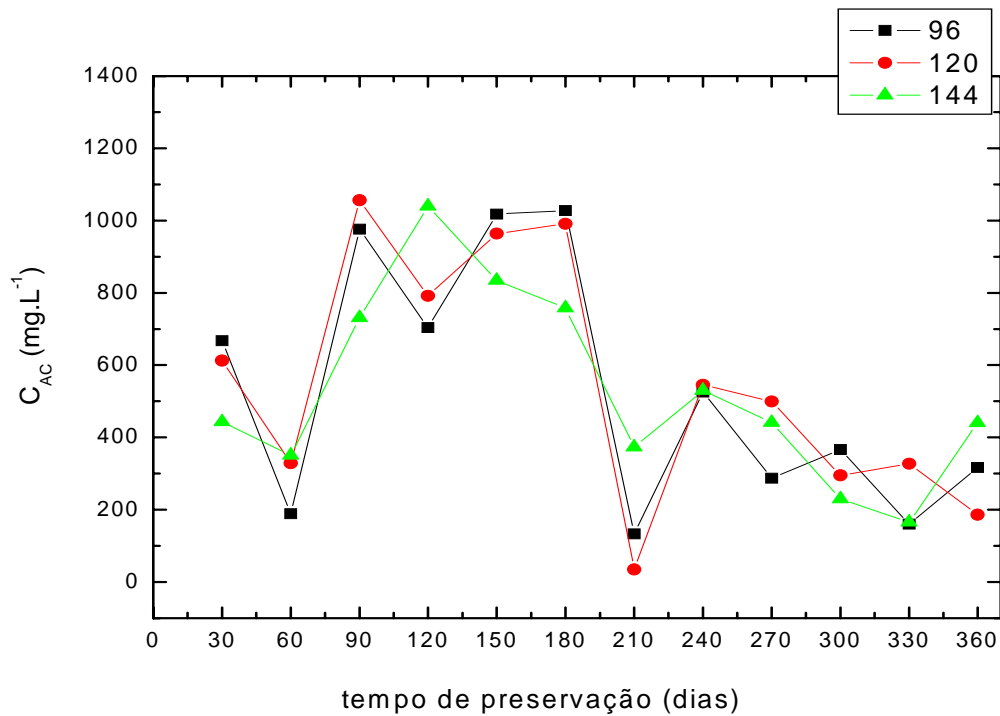


Figura 4.29. Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL1-20.

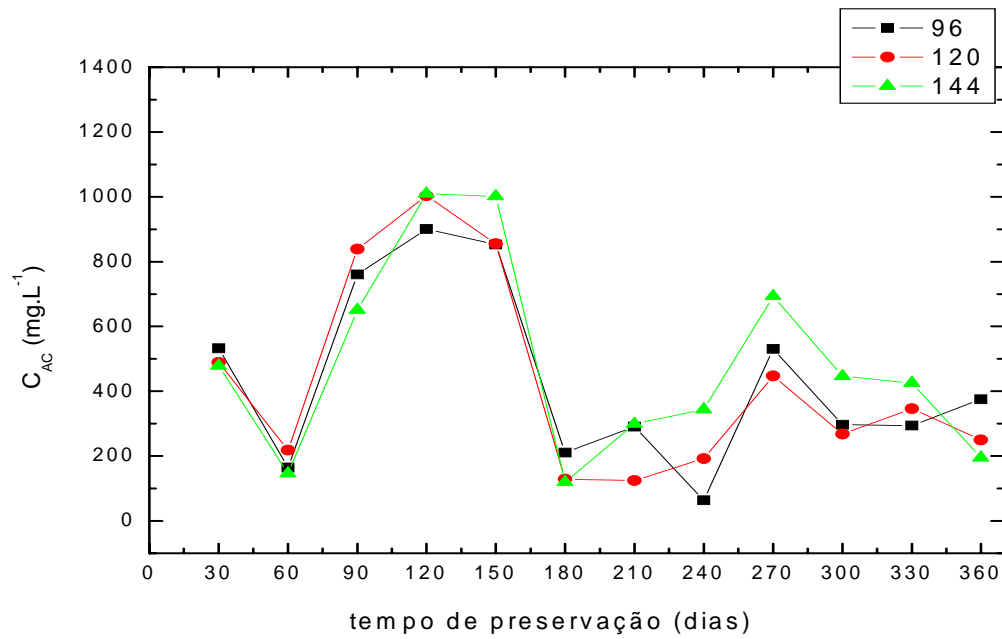


Figura 4.30. Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CL2-20.

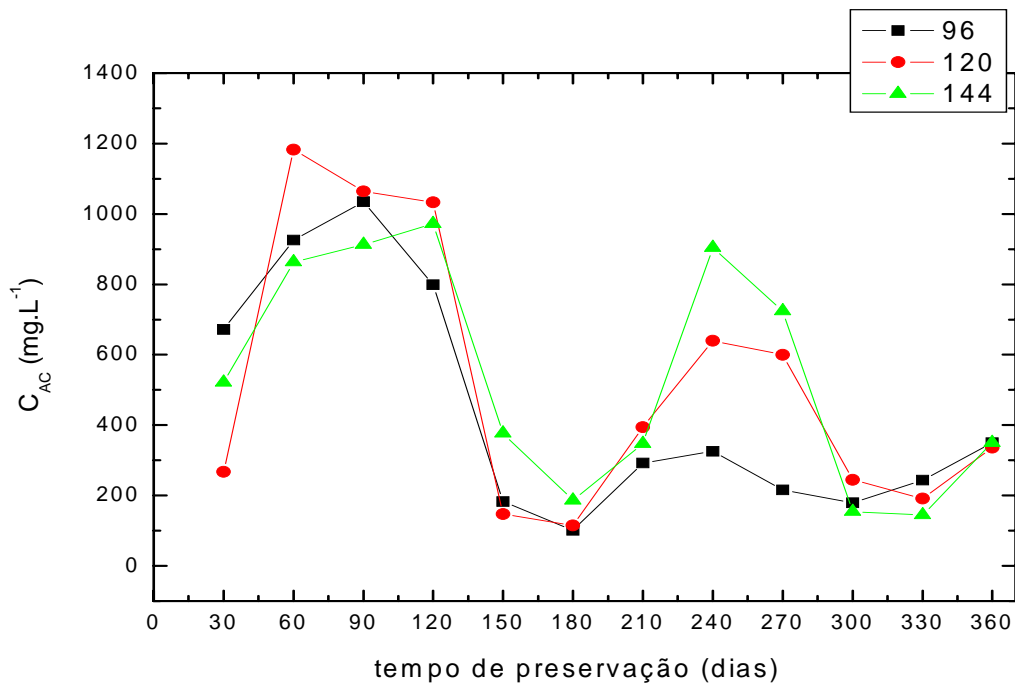


Figura 4.31. Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-10.

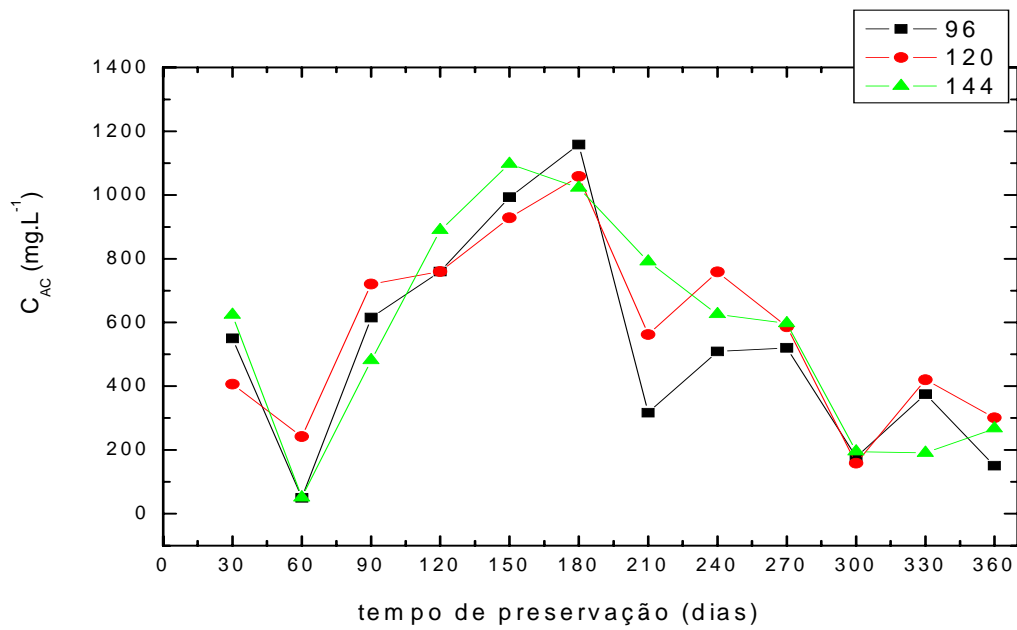


Figura 4.32. Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL2-10.

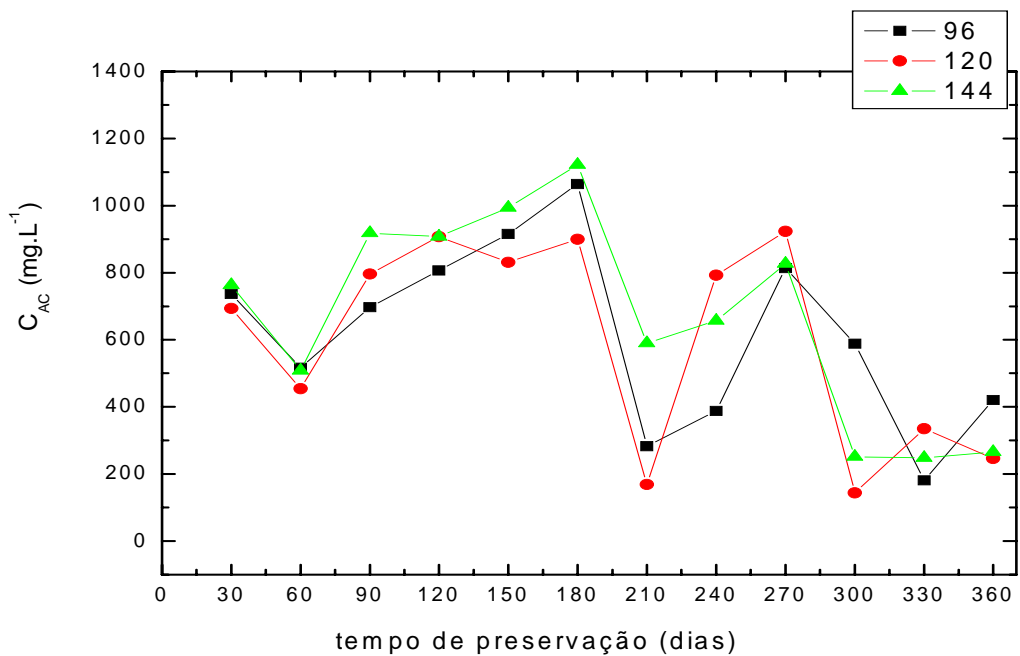


Figura 4.33. Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL1-20.

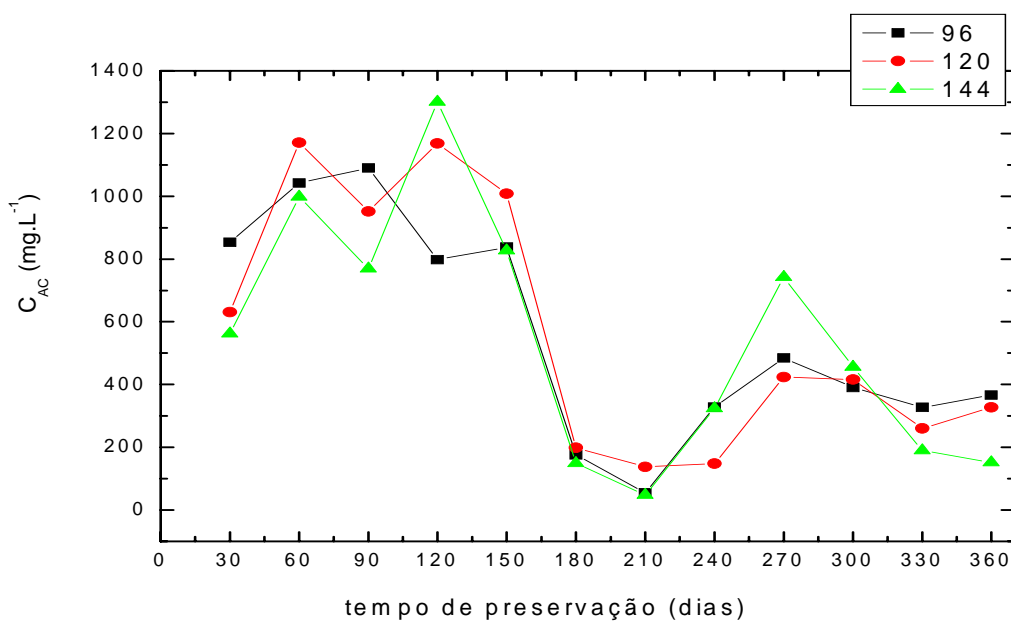


Figura 4.34. Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação CNL2-20.

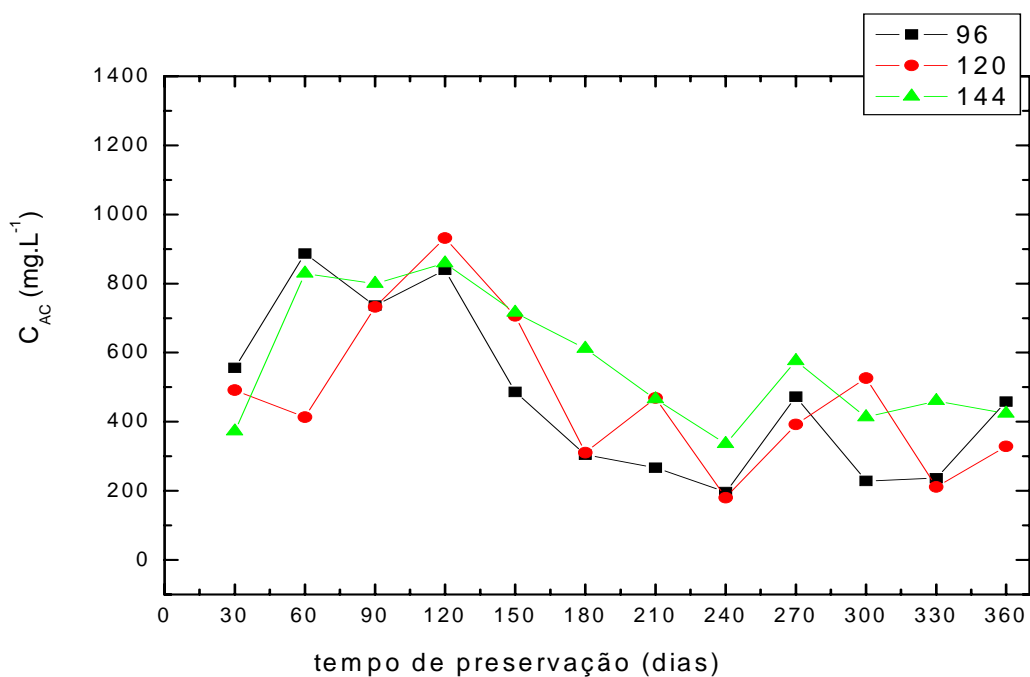
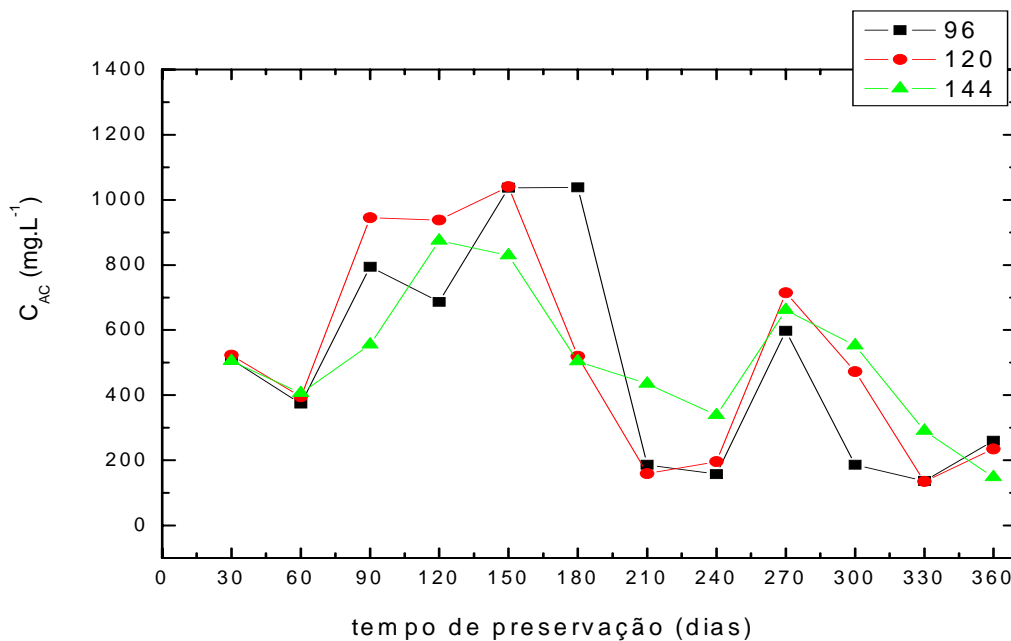


Figura 4.35. Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação E-10.

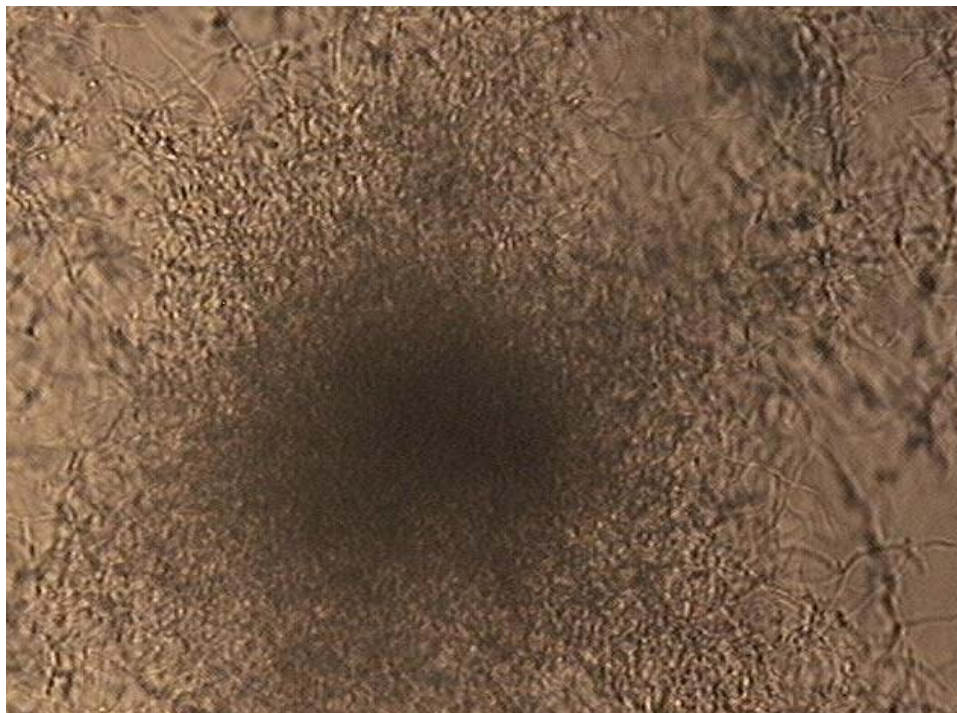


**Figura 4.36.** Perfis dos valores médios da produção de AC em 96, 120 e 144 horas de cultivo ao longo de 360 dias para a forma de preservação E-20.

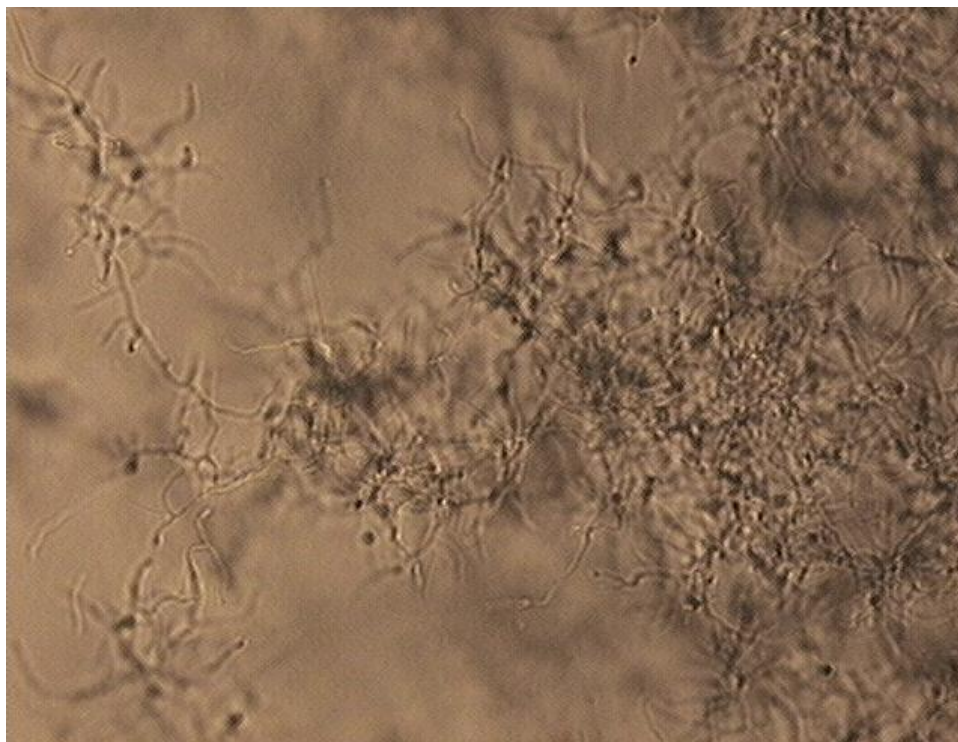
Em relação à análise morfológica, foram obtidas imagens microscópicas ao final das etapas de reativação dos 120 cultivos. Essa análise foi realizada para verificar os tipos de morfologia da bactéria crescida após determinados tempos de armazenamento, não sendo realizada uma análise mais refinada das imagens.

Constatou-se nas imagens oriundas de microrganismos armazenados na forma vegetativa (micélios) morfologias diversas como pellets, clumps, filamentos livres não ramificados e filamentos livres ramificados, independente das condições de preservação. No entanto, a morfologia dos microrganismos preservados na forma de esporos apresentaram somente presença de filamentos livres. Uma alta concentração de esporos no inóculo resulta em um crescimento na forma filamentosa, ao passo que uma baixa concentração de esporos provoca a formação de “pellets” (Foster, 1949). Microrganismos preservados na forma de células vegetativas apresentaram em suas imagens algumas formações de “pellets”.

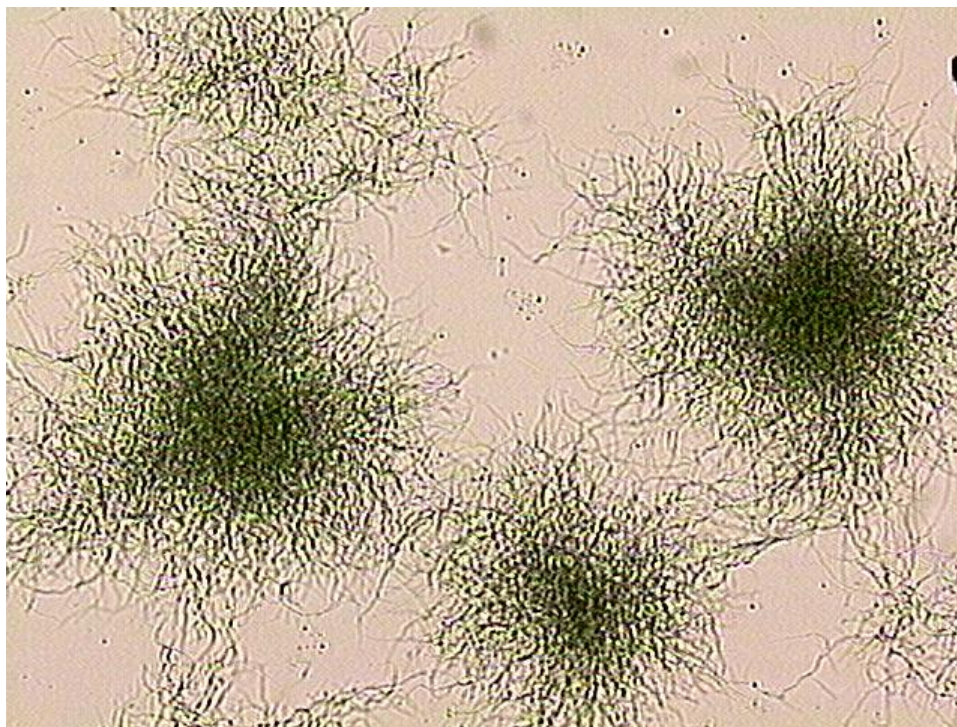
Como ilustração, imagens aleatórias de cinco desses cultivos estão apresentadas nas Figuras 4.37 a 4.41. Pode-se observar algumas imagens a presença de “pellets” e de filamentos livres dispersos.



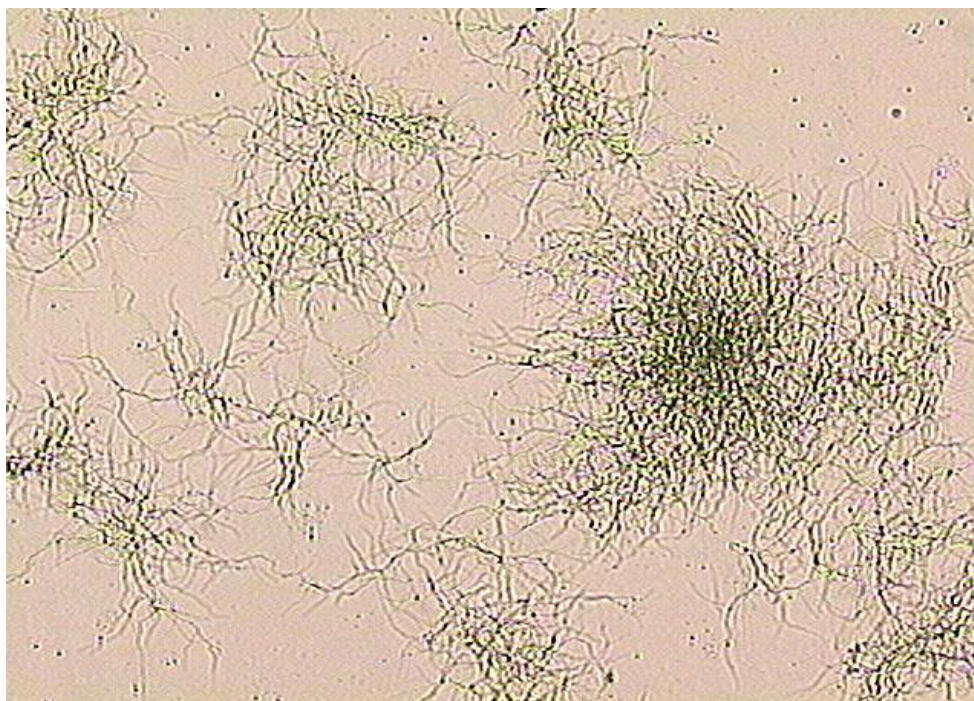
**Fig 4.37. “Pellet” presente no inóculo preservado na forma CNL2-20 após a etapa de reativação (aumento de 40x)**



**Fig 4.38. Forma filamentosa de *S. clavuligerus* preservados na forma CNL1-20 após a etapa de reativação (aumento de 40x)**

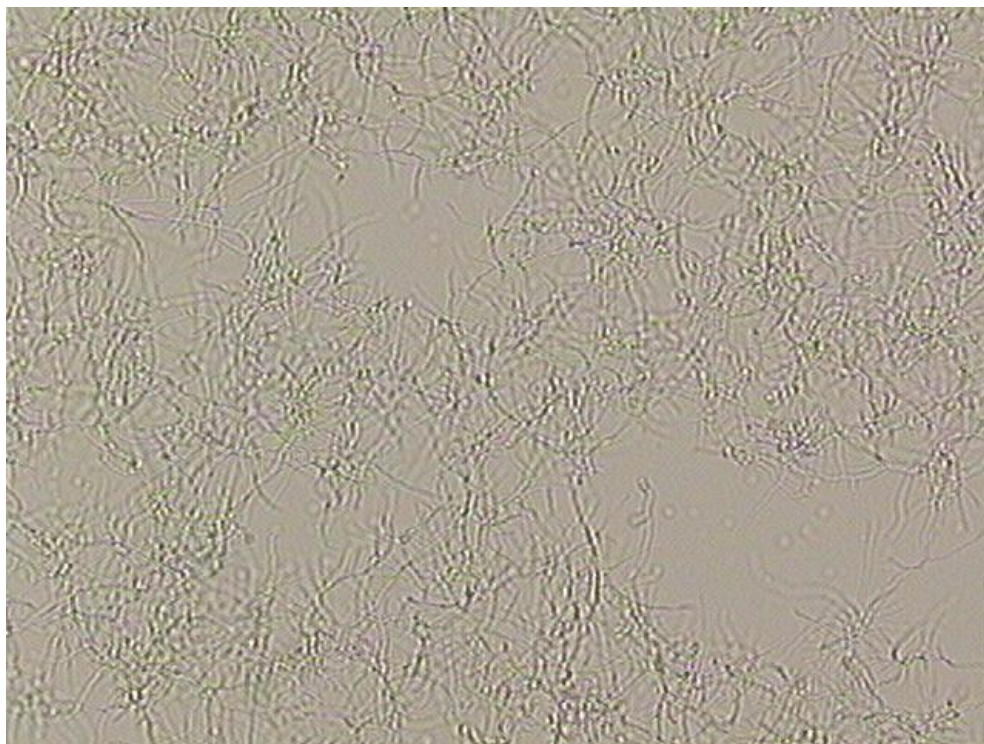


**Fig 4.39. “Pellets” presentes no inóculo preservados na forma CL2-20 após a etapa de reativação (aumento de 10x)**



**Fig 4.40. Micélios de *S. clavuligerus* preservados na forma CL2-20 após a etapa de reativação (aumento de 10x)**





**Fig 4.41. Forma filamentosa no ensaio preservados na forma E-10 após a etapa de reativação  
(aumento de 20x)**

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia de preservação e manipulação da linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, através da avaliação de 10 modos diferentes de preservação que foram acondicionadas em criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se o glicerol como um composto crioprotetor. Durante o decorrer dos ensaios realizados a cada 30 dias no decorrer de 1 ano foi constatada a perda da viabilidade e estabilidade celular da linhagem. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- houve uma grande variabilidade entre os valores de concentração celular para as diversas condições de preservação empregadas e nos 12 cultivos realizados, não sendo possível relacionar o crescimento celular com a produção de AC e com as condições de preservação.
- independentemente da forma de preservação, as produções de AC ocorreram aleatoriamente em 96, 120 e 144 horas de cultivo.
- com relação à viabilidade celular, as mesmas mantiveram-se praticamente constantes nos dois conjuntos de criotubos com esporos ao longo de um ano de preservação.
- a porcentagem do agente crioprotetor (glicerol) influenciou na média de produção para os microrganismos preservados com uma ou duas etapas crescimento.
- nos conjuntos de criotubos com uma etapa de crescimento e com lavagem das células a perda na produção de AC no final de um ano foi maior em relação ao valor inicial, comparando com os conjuntos de criotubos com duas etapas de crescimento.
- nos conjuntos de criotubos com uma etapa de crescimento e sem lavagem das células a perda na produção de AC no final de um ano foi menor em relação ao valor inicial, comparando com os conjuntos de criotubos com duas etapas de crescimento.
- Com exceção do CL1-10, todos os conjuntos de criotubos com lavagem de células apresentaram uma perda menor no final de 1 ano em relação aos criotubos de células não lavadas.
- Com exceção de CNL2-20, todos os criotubos de células vegetativas armazenados com 20% de glicerol, tiveram menor perda na produção de AC no final de um ano, comparando com os criotubos com 10% de glicerol.
- em linhas gerais, quanto à estabilidade dos criotubos, pode-se notar que houve certa variabilidade entre os cultivos, o que pode ter sido influenciada por outros fatores como

quantidades diferentes de células nos criotubos do mesmo lote e a variação de pH ao longo dos cultivos.

- em todos os conjuntos de criotubos houve uma queda da produção de AC, alguns a partir de 120 dias outros em 150 e 180 dias.
- Em relação às produções de AC obtidas, o valor máximo alcançado foi de  $1300 \text{ mg.L}^{-1}$  em 144 h, no modo de preservação CNL 2-20.
- Em relação à análise morfológica, microrganismos preservados na forma de esporos apresentaram somente presença de filamentos livres e microrganismos preservados na forma de células vegetativas apresentaram em suas imagens algumas formações de “pellets”.
- a condição de preservação E-10 apresentou uma viabilidade maior que a condição E-20 durante os 360 dias de armazenamento, sendo que a perda de produção de AC após 360 dias foi de 18% em comparação com a condição E-20 que foi de 50%. Sendo, portanto a melhor condição de preservação (mais estável) entre os criotubos preservados na forma de esporos.
- As formas de preservação CL1-20 e CL2-20 foram as melhores condições de preservação (mais estável) entre os criotubos preservados na forma de células vegetativas, apresentando menores perdas na produção de AC no final de um ano e um pico de produção entre 150 e 180 dias.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M., **Introduction to soil microbiology**, 2a. edição ,New York, John Wiley & Sons, 1977,p.467.

ÂNGELO, F. F; *et al.*, **Utilização de diferentes tratamentos para a conservação de bactérias lácteas**. In: 24ºCongresso Brasileiro de Microbiologia , Brasília, 2007.

ASHWOOD-SMITH, M.J. **Preservation of microorganisms by freezing, freeze-drying and desiccation**, in: M.J. Ashwood- Smith, J. Farrant (Eds.), *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, Pitman Medical, Tunbridge Wells, 1980,p. 219–252.

BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J., **Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and another clavans**, *Natural Product Report*, v.14, no 4, p.309-333, 1997.

BALLOWS, A.; **The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation, identification, applications**, New York, Springer-Verlag, 2a. edição, 1992, v.1.

BAPTISTA–NETO, A.; **Estudo do processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular**. Dissertação de Doutorado PPG-EQ-UFSCar, São Carlos, 2004.

BERSANETTI, P. A. *et al.*, **Estudo cinético da degradação do ácido clavulânico**, *Biochemical Engineering Journal*, 2005, v. 23, p. 31–36.

BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. **Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole**. *Analyst*, 1982, v. 107, p. 1241-1245.

BUTTERWORTH, D. In: E.J. Vandamme, *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, Ed., New York, by Marcel Decker, Inc. **Clavulanic Acid: properties, biosynthesis, and fermentation.**, 1984, p.225-235.

COLE, M.; HOWARTH,T.T; READING, C. **Antibiotic from *Streptomyces Clavuligerus***. U.S. Pat. 4,529,720. Jul.16, 1985.

- CORBETT, K. **Production of antibiotics**. In: BU'LOCK, J.; KRISTIENSEN, B. *Basic Biotechnology*, Academic Press, 1987, p. 425-448.
- COSTA, C.P., FERREIRA, M.C., **Preservação de Microrganismos: Revisão**, *Revista de Microbiologia*, 1991, v.22, n.3, p.263-268.
- ESSACK, S.Y. **The development of  $\beta$ -lactam antibiotics in response to the evolution of  $\beta$ -lactamases**. *Pharmaceutical Research*, 2001, v.18, n.10, p. 1391-1399.
- FARRANT, J., General observations on cell preservation. In: M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Eds. **Low Temperature Preservation in Medicine and Biology**, Pitman Medical Limited, Kent, England, 1980, p. 1-18.
- FIGUEIREDO, M. B. **Métodos e Preservação de Fungos Patogênicos**. *Biológico*, São Paulo, 2001, v.63, n.1/2, p.73-82.
- FOSTER, J.W. **Chemical activities of fungi**, Academic Press, New York, 1949, p.27-75.
- GHERNA, R. Preservation. Em: Gerhardt P. **Manual of Methods for General bacteriology**. 2<sup>nd</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1981, p. 208-217.
- GOUVEIA, E.R., **Desenvolvimento do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585**, p.156, Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2001.
- HAKIMELAHI, G.H. *et al.* **Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a series of  $\beta$ -Lactam- Based Prodrugs**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, v10, p. 3489-3498.
- HILL, L.R. **Preservation of Microorganisms**. *Essay in Applied Microbiology*. Edited by J.R. Norris and M. H. Richmond, John Wiley & Sons Ltd, 1981, p 1-30.
- HOCKENHULL, D.J. Antibiotics. In: Rainbow, C.; Rose, A M.; **Biochemistry of industrial microorganism**, Academic Press, New York, USA, 1980.
- HUBÁLEK, Z, **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms**, *Cryobiology*, 2003, v.46, p.205-229.

- INOUE, O. O. **Estudo da Influência da concentração e dos componentes do óleo de soja sobre a produção de salinomicina**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo-Brasil, p.152, 2001.
- KEITH, S.C., **Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water**, Science, 1913,v.37, p. 877–879.
- KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H. J. **The Family Streptomycetaceae**. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G., eds. The Prokaryotes. Berlin, Springer-Verlag, 1992, v. 1, p. 921-995.
- KUSNETSOV, V., O. BUSHUEVA, *Antibiotics*, **18**, 1973, v.10, p.890-895.
- LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites**, New York, Plenum Press, 1993, p.19-131.
- LAVARDA, S. C. S.; ARAUJO, M. L. G. C., **Estudo de condições de imobilização de células de Streptomyces clavuligerus**. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis. Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.
- LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Introduction to the order *Actinomycetales*, In: Starr, M. P.; Stalp, H.; Tryper, H. G.; Balawi, A.; Schlegel, H. G.; The prokaryotes: **A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. New York, Springer-Verlag, 1981.
- LOVELOCK, J.E, BISHOP,M.W.H., **Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide**, Nature , 1959, v.183, p.1394–1395.
- MARANESI, G.L.*et al.*, **Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by Streptomyces clavuligerus ATCC 27064**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, , 2005, v.21, n.4. p.509-514.
- MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S. M. P. **Preservação de bactérias fitopatogênicas**. Manual de Práticas em Fitobacteriologia. 2ª ed. Recife.UFRPE, 2000, p.35-45.

- MAURA, B.R. et al. **Conservación de cepas vacunales de *Leptospira* a -70° C.** Instituto Finlay, 2006.
- MAZUR, P.; S.P. LEIBO.; E.H.Y. CHU; **A two factor hypothesis of freezing injury.** Experimental Cell Research ,1972, v.71, p.345-355.
- MERYMAN, H.T.;**Cryoprotective agents**, Cryobiology, 1971, v.8, p.173–183.
- MOO-YOUNG, M., **Comprehensive biotechnology: The principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**, Oxford, U.K., Pergamon Press, 1985, v.1, p.688.
- NASH, T.; **Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing**, In: H.T. Meryman (Ed.), Cryobiology, Academic Press, London-New York, 1966, p. 179–211.
- NEELY, A. N.; HOLDER, I. A.; **Antimicrobial resistance**, Burns, 1999, v.25, p17-24.
- NEI, T.; T. ARAKI; T. MATSUSAKA; **Freezing injury to aerated and non-aerated cultures of *Escherichia coli***. In T. Nei, Ed. Freezing and Drying of Microorganisms. University of Tokyo Press, Tokyo, Japan,1969.
- NEVES, A.A; VIEIRA; L.M, MENEZES, J.C. **Effects of Preculture Variability on Clavulanic Acid Fermentation. Boitech and Bioengineering**, v.72, n.6, 2001.
- PAMBOUKIAN, C. R. D; GUIMARÃES, L. M; FACCIOOTTI, M.C; **Appllications of Image Analysis in the Characterization of *Streptomyces Olindensis* in Submerged Culture.** Brazilian Journal of Microbiology, 2002, v.33, p 17-21.
- PHAFF, H.J. **Industrial Microorganisms.**, Scientific American, v.77, n.245,v.3, 1981.
- PODLECH, P. A. S; et al. **Avaliação de diferentes crioprotetores na conservação de *Saccharomyces boulardii* por liofilização.** In: Simpósio Nacional de Fermentação, 11., São Carlos,1996.

- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S.; **Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures**, Nature, 1949 v.164, p.666.
- READING, C. e COLE, M. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. American Society for Microbiology, 1977, v. 11, n° 5, p.852-857.
- ROMEIRO, R.S. **Preservação de bactérias fitopatogênicas**. In: Romeiro, R.S. (ED) Métodos em Bacteriologia de Plantas. Viçosa. UFV, 2001, p.87-96.
- ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. **Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus***. Applied Environment Microbiology, 1984, v.20, p.318-325.
- ROSA, J.C. et al. **Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus***. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2004.
- SANCHES, L, BRAÑA, A.F. **Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus***. Microbiology, 1996 v. 142, p. 1209-1220.
- SANCHEZ, S; DEMAIN, A.L. **Metabolic regulation of fermentation process**. Enzyme and Microbial Technology, 2002, v.6153, p. 1-12.
- SILVA, L.F. *et al.*, **Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil**. Revista de Microbiologia, v.23, n.3, p.177-182, 1992.
- SIMIONE, P.F., **Cryopreservation Manual**, M.S. of the American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nunc International Corp., 1998.
- TADDEI, A.; TREMARIAS, M. M.; CAPRILES, C.H.; **Viability studies on Actinomycetes**. **Mycopathologia** v. 143, p. 161-164, 1999.
- TAO, D., LI, P.H., **Classification of plant cell cryoprotectants**, J. Theor. Biol. v.123 p.305–310, 1986.



TUCKER, K. G.; THOMAS, C.R. **Effect of biomass concentration and morphology on the rheological parameters of *Penicillium chrysogenum* fermentations broths.** Trans. I Chem. E., v.71, p111-171,1993.

VINING, L.C. **Secondary metabolism.** In: Rehn, H.J.; Reed, G., eds. Biotechnology. Weinheim, VCH, 1986, v. 4, p.19-38.

WANG, Y.; *et al.*, **Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*,** Process Biochemistry, v.40, ed.3-4, p.1161-1166, 2005.

WHITAKER, A.; LONG,P.A. **Fungal pelleting.** Process Biochemistry, v.8, p.27-31,1973.

YOICHEVA, L, *et al.*, **Influence of the long-term preservation on some biological features of three streptomycetes strains, producers of antibiotic substances,** Journal of Culture Collections, 2002,n.1, v.3, p.25-32.