



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

INGRID CAPUANO ANTONIO

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE LIOFILIZAÇÃO PARA COLEÇÕES DE
CULTURAS MICROBIANAS**

CAMPINAS

2020

INGRID CAPUANO ANTONIO

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE LIOFILIZAÇÃO PARA COLEÇÕES DE
CULTURAS MICROBIANAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientadora: Dra. Derlene Attili de Angelis

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA INGRID CAPUANO ANTONIO E ORIENTADA PELA DRA. DERLENE ATTILI DE ANGELIS.

CAMPINAS

2020

Ficha Catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira – CRB 8/6972

An88o Antonio, Ingrid Capuano, 1993-
Otimização do protocolo de liofilização para coleções de
culturas microbianas / Ingrid Capuano Antonio. – Campinas,
SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Derlene Attili de Angelis.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Micro-organismos - Coleção e preservação. 2. Liofilização. 3.
Delineamento experimental. I. Angelis, Derlene Attili de, 1963-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Optimization of the freeze drying protocol for
collections of microbial cultures

Palavras-chave em inglês:

Microorganisms - Collection and
preservation Freeze drying
Experimental design

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Derlene Attili de Angelis
[Orientador] Milene Gomes
Barbosa

André Rodrigues

Data de defesa: 28-04-2020

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Identificação e informações acadêmicas do (a) aluno (a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3473-616>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4554710540871261>

Campinas, 28 de Abril de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. (a). Derlene Attili de Angelis

Dr. (a). Milene Barbosa Gomes

Dr. (a) André Rodrigues

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação do Programa de Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos da Unidade do Instituto de Biologia.

*Dedico este trabalho aos meus queridos amigos e familiares, pois sem o incentivo e
companheirismo de vocês nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Juntamente com a defesa do mestrado encerro mais um ciclo acadêmico em minha vida, todos eles marcados por esforços, dedicação, crescimento pessoal e profissional e muito, muito aprendizado. Em toda essa jornada tive o privilégio de contar com o apoio de muitas pessoas e aqui gostaria de expressar minha profunda gratidão àqueles que me fizeram enxergar que tudo é possível:

A Deus em primeiro lugar, pois a Ele recorri diversas vezes em busca de conforto e refúgio nas horas em que as dificuldades pareciam não ter fim. Agradeço por ter me dado tanta força e luz nas horas em que a minha mente pensava apenas que a única saída era desistir.

À minha família por todo amor, carinho e torcida. Foi a minha primeira experiência acadêmica morando longe de vocês e por tantas vezes a saudade apertou o coração, mas hoje, ao final de tudo eu agradeço e dedico esta conquista á vocês. Obrigada por todos os sacrifícios e renúncias que fizeram por mim.

Ao meu noivo, Vinicius, por ter sido meu porto seguro em mais essa jornada. Obrigada por ter me deixado desabafar contigo, por ter me dado paz nos momentos em que eu estava vivendo uma turbulência, por ter tido paciência. Obrigada por me motivar e me mostrar que eu era capaz em todas as vezes que eu pensei o contrário. Obrigada por dizer que se orgulha de mim, saiba que esse título tem muito de você. Obrigada simplesmente por existir. Eu amo muito você!

À minha querida orientadora Dra. Derlene Attili de Angelis, por ter me recebido como aluna, por ter me orientado neste trabalho, por ter me apoiado e confiado em meu potencial e por tanto ter me ensinado ao longo desses dois anos. Você é uma profissional incrível, dedicada, entusiasmada com o que faz e que valoriza as pessoas ao seu redor e isso me inspira muito. Obrigada por ser esse exemplo!

À professora Dra. Maria Isabel Rodrigues que dedicou o seu precioso tempo me auxiliando com as ferramentas estatísticas. Obrigada por ser essa pessoa iluminada e bondosa que surgiu em minha vida. Espero que Deus te abençoe cada vez mais em tudo o que você faz.

Aos colegas de laboratório da Divisão de Recursos Microbianos – DRM/CPQBA por todos os momentos de descontração e principalmente pelas trocas de experiências.

À divisão de recursos microbianos – DRM/CPQBA e sua equipe técnica: Gilberto, Túlio e Viviane por terem sido sempre tão solícitos comigo no desenvolvimento da

parte molecular do meu trabalho. À técnica e grande amiga Milena Binatti que não só contribuiu com o meu trabalho, mas também se tornou uma grande amiga. Querida, minha eterna gratidão por todos e tantos ensinamentos, conselhos, conversas, risadas, trocas de experiências. Você é uma profissional exemplar, que merece total reconhecimento pelo seu trabalho impecável. Neste trabalho há muito de você, que me orientou e me ajudou tanto do início ao fim. Saiba que minha vida estará de portas abertas para você e o Elias, seu esposo. Que continuemos nossa amizade.

Às minhas queridas amigas Milene e Joziane que levarei sempre em meu coração. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos dentro e fora do laboratório assim como todos os ensinamentos que vocês me deram.

Aos colegas Charles e Júnior da empresa JJ Científica por sempre me atenderem com esclarecimento de minhas dúvidas em relação à liofilização.

À direção e colaboradores do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos – BTPB, vinculado ao Instituto de Biologia - IB da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

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

A todas as pessoas que me auxiliaram direta ou indiretamente com a execução deste trabalho.

RESUMO

A utilização de recursos microbianos em setores da indústria vem crescendo devido à versatilidade de suas aplicações, que podem variar desde a produção de alimentos até a geração de produtos de alto valor agregado. Linhagens biotecnologicamente promissoras e de referência, geralmente encontram-se depositadas em coleções de culturas reconhecidas, as quais constituem instituições responsáveis por catalogar, autenticar, preservar e distribuir este material de forma assegurada. Dentre as técnicas empregadas pelas coleções microbianas, a liofilização é considerada uma das mais bem difundidas internacionalmente pelas vantagens que oferece, apesar de se tratar de um método nada elementar, que envolve muitas variáveis. A Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI/UNICAMP contempla o serviço de liofilização no seu escopo, utilizando um equipamento alemão (Christ Gamma 2-16 LSC). A fim de reduzir o tempo do processo para acompanhar sua intensa demanda de trabalho, a CBMAI tomou a iniciativa de otimizar o protocolo de sua rotina. O presente estudo visou atender essa necessidade, com base no desenvolvimento de um delineamento experimental fracionado $2^{4-1} + 3P.C.$ A partir de parâmetros do protocolo padrão (com 38h40 min. de duração) o delineamento gerou onze ensaios que foram testados selecionando linhagens com metabolismos distintos dentro dos principais grupos: fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Os ensaios mais bem-sucedidos foram os de número: 3 (18h05 minutos de duração), 4 (8h05 minutos de duração) e 8 (19h05 minutos de duração), capazes de reduzir a duração do processo em mais de 50% e mantendo a viabilidade celular. Os testes de validação (repetição dos ensaios classificados como satisfatórios) comprovaram a reprodutibilidade dos ensaios selecionados. As características macro e microscópicas foram analisadas após preservação. A liofilização é considerada uma técnica de conservação de longo tempo. Nesse estudo, uma reativação das amostras foi realizada após seis meses de estocagem e os resultados mostraram que não houve alterações significativas nos ciclos logarítmicos das contagens realizadas (UFCs) e nem em relação às características macro e microscópicas das culturas. As autenticações ao nível molecular asseguraram a pureza e a confiabilidade da identidade das linhagens utilizadas. Com base nos resultados obtidos deste estudo, pode-se concluir que a liofilização é passível de otimizações desde que realizadas com o embasamento de técnicas estatísticas como o delineamento experimental, capazes de compreender e avaliar todas as variáveis do processo. Os protocolos propostos servirão de orientação para outros laboratórios que utilizem um equipamento similar.

Palavras-chave: Preservação de micro-organismos, Liofilização, Delineamento experimental.

ABSTRACT

The use of microbial resources in sectors of the industry has been growing due to the versatility of their applications, which may vary from the food production to the generation of products with high added value. Biotechnologically promising and reference strains are generally deposited in recognized cultures collections, which constitute institutions responsible for cataloging, authenticating, preserving and distributing this material, in a confident way. Among the techniques used by microbial collections, the lyophilization is considered one of the most internationally spread, due to the advantages it offers, although it is a non-elementary method with many variables. The Brazilian Collection of Environmental and Industry Microorganisms - CBMAI / UNICAMP offers the freeze-drying service using a German equipment (Christ Gamma 2-16 LSC). In order to reduce the time of the process and keep up with its intense working demand, CBMAI searched for the optimization of its routine protocol. The present study aimed to meet this need, based on the development of a fractional experimental design $2^{4+1} + 3P.C$. From parameters of the standard protocol (38:40 long) the design generated eleven tests that were tested by using selected strains with distinct metabolisms within the main groups: filamentous fungi, yeasts and bacteria. The most successful trials were numbers: 3 (18:05 long), 4 (08:05 long) and 8 (19:05 long), capable of reducing the process time by more than 50% and maintaining cell viability. The validation tests (repetition of the tests classified as satisfactory) proved the reproducibility of the selected assays. Macro and microscopic characteristics were analyzed after preservation. Lyophilization is considered a long-term conservation technique. In this study, samples were reactivated after six months of storage. The results showed that there were no significant changes in the logarithmic cycles of the counts performed (CFUs) or in relation to the macro and microscopic characteristics of the cultures. Authentications at molecular level ensured the purity and reliability of the identity of the studied strains. Based on the results obtained from this study, it can be concluded that lyophilization is subject to optimizations as long as carried out on the basis of statistical techniques such as the experimental design, able to understand and evaluate all process variables. The proposed protocols will serve as guidance for other laboratories that use similar equipment.

Keywords: Preservation of Microorganisms, Freeze drying, Experimental design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e leveduras, pela técnica de gotas em ágar 0,1%.	26
Figura 2. Liofilizador importado Christ.	30
Figura 3. Bomba de vácuo utilizada no processo.	30
Figura 4. Demonstração do frasco 2R com tampa de borracha em primeiro estágio.	31
Figura 5. Termobloco utilizado para acoplar os frascos dentro do liofilizador.	31
Figura 6. Contagem pré e pós-liofilização para <i>T. longibrachiatum</i> de todos os ensaios realizados e ensaio padrão	34
Figura 7. Contagem pré e pós-liofilização para <i>C. globosum</i> de todos os ensaios realizados e ensaio padrão.	34
Figura 8. Taxa de perda de viabilidade celular para o grupo dos fungos filamentosos pós-ensaios realizados e padrão.	35
Figura 9. Contagem pré e pós-liofilização para <i>S. cerevisiae</i> de todos os ensaios realizados e ensaio padrão.	37
Figura 10. Contagem pré e pós-liofilização para <i>R. mucilaginosa</i> de todos os ensaios realizados e ensaio padrão.	37
Figura 11. Taxa de perda de viabilidade celular para o grupo das leveduras pós-ensaios realizados e padrão.	38
Figura 12. Contagem pré e pós-liofilização para <i>B. aryabhatai</i> de todos os ensaios testados e ensaio padrão.	39
Figura 13. Contagem pré e pós-liofilização para <i>S. leidyi</i> de todos os ensaios testados e ensaio padrão.	39
Figura 14. Comparativo da taxa de perda de viabilidade celular para todas as linhagens estudadas pós-ensaios testados e padrão	40
Figura 15. Características morfológicas de <i>C. globosum</i> após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f asco colorido com Azul de Lactofenol (1000x). g ascósporos limoniformes (400x). h ascoma com rizoides basais (400x).	42
Figura 16. Características morfológicas de <i>T. longibrachiatum</i> após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f conídios esféricos corados com Azul de Lactofenol (400x). g e h estruturas reprodutivas (conídios e fiálides) - (1000x).	43
Figura 17. Características morfológicas de <i>S. cerevisiae</i> após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento isolado. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f células leveduriformes após coloração de Gram (1000x).	44
Figura 18. Características morfológicas de <i>R. mucilaginosa</i> após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento isolado. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f células leveduriformes após coloração de Gram (1000x).	44
Figura 19. Características morfológicas de <i>B. aryabhatai</i> após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento isolado. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f bastonetes Gram positivos – cor roxa revelada na coloração de Gram (1000x).	45

Figura 20. Características morfológicas de <i>S. leidy</i> após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento isolado. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f bastonetes Gram negativos – cor vermelha revelada na coloração de Gram (1000x).	46
Figura 21. Características morfológicas de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f e g estruturas reprodutivas (conídios e fiálides) - (aumento de 1000x). h conídios esféricos colorido com Azul de Lactofenol (400x).	49
Figura 22. Características morfológicas de <i>C.globosum</i> após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f ascósporos limoniformes (400x).	50
Figura 23. Características morfológicas de <i>S. cerevisiae</i> após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f células leveduriformes coradas após coloração de Gram (1000x).	52
Figura 24. Características morfológicas de <i>R. mucilaginoso</i> após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento isolado. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f células leveduriformes coradas após coloração de Gram (1000x).	52
Figura 25. Características morfológicas de <i>B. aryabhatai</i> após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas.. a Crescimento isolado. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f bastonetes Gram positivos – cor roxa revelada pela coloração de Gram (aumento de 1000x).	54
Figura 26. Características morfológicas de <i>S. leidy</i> após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. a Crescimento isolado. b pós-ensaio padrão. c pós-ensaio 3. d pós-ensaio 4. e pós-ensaio 8. f bastonetes Gram negativos – cor vermelha revelada na coloração de Gram (aumento de 1000x).	55
Figura 27. Análise de distância filogenética da linhagem <i>B. aryabhatai</i> .	58
Figura 28. Análise de distância filogenética da linhagem <i>S. leidy</i> .	59
Figura 29. Análise de distância filogenética da linhagem <i>S. cerevisiae</i> .	59
Figura 30. Análise de distância filogenética da linhagem <i>R. mucilaginoso</i>	60
Figura 31. Análise de distância filogenética da linhagem <i>C. globosum</i> .	60
Figura 32. Análise de distância filogenética da linhagem <i>T. longibrachiatum</i> .	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens selecionadas para o estudo.	24
Tabela 2. Protocolo CBMAI adotado no estudo como “Protocolo padrão”.	27
Tabela 3. Tabela de níveis das variáveis do processo.	27
Tabela 4. Aplicação da tabela de níveis na matriz dos ensaios.	28
Tabela 5. Ensaios gerados pelo Delineamento Fracionado $2^{4-1} + 3$ P.C.	28
Tabela 6. Primers e suas condições de amplificação.	33
Tabela 7. Reagentes e volume para reação de sequenciamento.	33
Tabela 8. Protocolos otimizados específicos para cada linhagem.	41
Tabela 9. Resultados dos testes de validação dos ensaios otimizados para fungos filamentosos.	47
Tabela 10. Resultados dos testes de validação dos ensaios otimizados para fungos leveduras.	47
Tabela 11. Resultados dos testes de validação dos ensaios otimizados para fungos bactérias.	48
Tabela 12. Contagem dos fungos filamentosos após 180 dias de preservação.	48
Tabela 13. Contagem das leveduras após 180 dias de preservação.	51
Tabela 14. Contagem das bactérias após 180 dias de preservação.	53
Tabela 15. Análise de efeitos dos fatores do delineamento sob a perda de viabilidade dos micro-organismos – fungos filamentosos e leveduras ¹ .	56
Tabela 16. Análise de efeitos dos fatores do delineamento sob a perda dos micro-organismos – bactérias ¹ .	56
Tabela 17. Agrupamentos do teste de Tukey.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA – Ágar Dextrose Batata.

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

CBMAI – Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria.

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.

°C – Graus Celsius.

DNA – Ácido Desoxirribonucleico.

DRM – Divisão de Recursos Microbianos.

FAPESP – Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

h – horas.

ITS – Espaçadores transcritos internos (sigla em inglês).

MA2% - Extrato de malte a 2%.

min – minutos.

mL – mililitros.

rpm – rotações por minuto.

% - por cento.

P.C – Ponto central.

PCR – Reação em cadeia da polimerase.

TSA – Ágar Soja Trypticaseína.

µL – microlitros.

UFC – Unidades Formadoras de Colônias.

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas.

UV – Ultravioleta.

YMA – Ágar malte de levedura (sigla em inglês).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.	17
2.1 Importância dos micro-organismos estudados.	17
2.2 Preservação de micro-organismos.	19
2.2.1 Liofilização e suas etapas.	20
2.3 Delineamento experimental x Otimização do processo de liofilização.	21
3. OBJETIVOS.	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.	24
4.1 Micro-organismos.	24
4.1.1 Viabilidade, pureza e caracterização macro e microscópica dos micro-organismos.	24
4.1.2 Contagem dos micro-organismos.	24
4.1.3 Fotodocumentação dos micro-organismos.	26
4.2 Delineamento experimental.	26
4.2.1 Montagem do planejamento.	26
4.2.2 Forma de análise dos resultados do delineamento.	28
4.3 Liofilização.	29
4.3.1 O equipamento.	29
4.3.2 Preparo das amostras microbianas.	30
4.3.3 Reativação.	31
4.4 Autenticação molecular dos isolados.	32
4.4.1 Extração do DNA.	32
4.4.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e purificação dos produtos de PCR.	32
4.4.3 Sequenciamento dos produtos da PCR.	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	33
5.1 Viabilidade celular pré e pós-liofilização dos ensaios otimizados.	33
5.1.1 Contagem de viabilidade – Fungos Filamentosos.	33
5.1.2 Contagem de viabilidade – Leveduras.	36
5.1.3 Contagem de viabilidade – Bactérias.	38
5.2 Características morfológicas das linhagens.	41
5.2.1 Fungos Filamentosos.	41
5.2.2 Leveduras.	43
5.2.3 Bactérias.	45
5.3 Validação dos ensaios testados.	46
5.4 Reativação dos preservados após seis meses.	48
5.4.1 Fungos Filamentosos.	48
5.4.2 Leveduras.	50
5.4.3 Bactérias.	53
5.5 Análise estatística.	55
5.6 Autenticação molecular.	58
6. CONCLUSÃO.	62
7. REFERÊNCIAS.	63
ANEXOS	71
Anexo I: Declaração de Bioética / e ou Biossegurança.	71
Anexo II: Declaração de direito autoral.	72

1. INTRODUÇÃO

O uso da biotecnologia visa substituir os processos existentes menos amigáveis ao meio ambiente (EMBRAPA, 2017). Nesse desafio, os micro-organismos são grandes aliados, pois podem gerar produtos que melhoram a qualidade de vida da sociedade humana, causando menor impacto. Dentro desse cenário, surge o conceito de bioeconomia, a partir das inovações na área das ciências biológicas tendo direta ligação com o emprego de fungos e bactérias, dentre outros. Até 2030, espera-se que setores industriais como os de produtos farmacêuticos e medicinais, advindos da aplicação de recursos genéticos, principalmente microbianos, movimentem a bioeconomia brasileira em 300 bilhões de euros (CNI, 2015).

O reconhecimento da importância dos recursos genéticos em nosso país é tanto, que sua utilização se encontra regida por recentes leis e decretos (LEI Nº 13.123, DE 20 DE MAIO DE 2015; DECRETO Nº 8.772, DE 11 DE MAIO DE 2016). Grande parte deste patrimônio encontra-se (ou deveria se encontrar) sob a guarda de coleções biológicas, instituições responsáveis por proteger, catalogar, caracterizar, preservar e distribuir material biológico autenticado e de confiabilidade assegurada.

Dentre as inúmeras razões pelas quais os recursos microbianos devem ser preservados estão:

1. Participação em processos industriais gerando produtos de alto valor agregado como novos antibióticos, terapêuticos, antiparasitas e antitumorais; policetídeos, probióticos e vitaminas; biomoléculas, enzimas e polímeros; produtos da panificação, bebidas, queijos, ácidos orgânicos, corantes e ração animal; novos cosméticos e aromas; sem mencionar os biocombustíveis, tidos como a terceira revolução industrial (DEMAIN, 2000; PATERSON e LIMA, 2016).

2. Envolvimento no agronegócio em processos como a fixação de nitrogênio; controle biológico de pragas agrícolas e urbanas; biofertilização, bioestimulação e promoção do crescimento vegetal; aumento da resistência de plantas às mudanças climáticas e da resposta à adição de fertilizantes, consequentemente aumentando a produtividade da agricultura e da pecuária (BETTIOL et al., 2012; LANGE et al, 2012).

3. Participação na área do meio ambiente em várias estratégias desenvolvidas para o saneamento ambiental, como: tratamento microbiológico da água e de efluentes de diversas indústrias (alimentícia, papelaria, de couro, farmacêutica, dentre outras); biorremediação de hidrocarbonetos, pesticidas, fenóis, corantes, plásticos e demais resíduos; biosorção de metais pesados; biofiltração de gases poluentes; bioindicadores

da qualidade do ar; análises de toxicidade e mutagenicidade (SINGH, 2006; ALVAREZ e POLTI, 2014; BORNSCHEUER, 2016).

Para cumprir com seu papel de forma eficiente, as coleções devem oferecer mais de uma técnica de preservação, a fim de atender a diversidade de metabolismos que conhecemos e garantir a integridade de suas linhagens (PAOLI, 2005). A técnica de liofilização é adequada para a maioria dos micro-organismos, e por este motivo foi adotada por grandes centros de preservação nacionais e internacionais. Coleções bem estabelecidas vêm buscando aprimorar essa técnica para reduzir custos e atingir excelência em seus resultados, mas guardam seus protocolos como um “segredo comercial” (EBSLA, 2011), forçando coleções mais novas a buscar suas próprias soluções.

A Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI / CPQBA – UNICAMP desenvolve atividades na área de microbiologia que atende demandas de ensino, pesquisa e indústria. Ao longo de quase duas décadas de atividades, se capacitou para também oferecer serviços de liofilização de culturas. Com a crescente procura por essa técnica, tomou a iniciativa de aprimorar o protocolo até então utilizado.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou desenvolver um novo protocolo de liofilização para o equipamento utilizado na referida coleção, buscando menor tempo de processo, atendimento a diferentes grupos microbianos e a obtenção de um produto (inóculo) final puro, viável e de confiabilidade assegurada. Além disso, o presente projeto teve o propósito de capacitar recursos humanos para execução desse método de preservação, alinhado aos padrões de qualidade exigidos pela ISO NBR 17025-17. Para garantir a robustez dos resultados, aplicamos o delineamento experimental, considerado uma ferramenta estatística poderosa na otimização de processos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância dos micro-organismos estudados

As linhagens utilizadas neste estudo pertencem a uma coleção de pesquisa de micro-organismos endofíticos, grupo que constitui uma parte significativa da diversidade ainda pouco explorada. Pelo interesse crescente nesses organismos e pelo fato de apresentarem características distintas de metabolismos, optamos por utilizá-los nos testes realizados.

Desde sua primeira descrição por Bary (1866) várias definições para micro-organismos endofíticos surgiram. Petrini (1991) define como sendo a comunidade microbiana que habita o interior das plantas sem causar danos aparentes. Hallmann et al. (1997) considera endófitos todos aqueles que podem ser recuperados do interior da planta após desinfecção externa para eliminar os epifíticos. Outra classificação, proposta por Azevedo e Araújo (2007), diz que os endofíticos são todos os micro-organismos que podem ou não crescer em meios de cultivo artificial, habitando o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar danos aparentes e sem produzir estruturas externas que emergem dos vegetais, como os que formam nódulos em raízes. Sabe-se também que a depender do estado fisiológico da planta os endofíticos podem se comportar como oportunistas e agindo como fitopatógeno. Mas, de modo geral, eles atuam como sintetizadores químicos onde as moléculas produzidas (alcalóides, flavonoides e esteroides) podem promover o crescimento da planta e protege-la da ação de antagonistas (AZEVEDO; ARAÚJO, 2005; SANTOS et al., 2017).

O gênero *Trichoderma*, da família Hypocreaceae, compreende fungos de vida livre que se reproduzem assexuadamente e são facilmente encontrados em solos de regiões tropicais e temperadas. Geralmente são caracterizados por apresentarem células conidiogênicas que dão origem aos conídios – esporos (KRUGER; BACCHI, 1995). No estudo de Silva (2017) a linhagem *Trichoderma longibrachiatum* (CBMAI xxx) apresentou boa produção de flavonoides e fenóis totais. Sabe-se que espécies de *Trichoderma* apresentam importante aplicação para controle de fitopatógenos, pois compete com eles por espaço (MELO, 1998) e possuem potencial de promover o crescimento vegetal (MACHADO et al., 2012). Atuam como estimulantes do crescimento do sistema radicular através de fitohormônios e melhoram a resistência diante de fatores bióticos desfavoráveis (HARMAN, 2000).

O Ascomiceto *Chaetomium*, pertencente à família Chaetomiaceae, é conhecido pela sua produção de esporos em esporângios específicos, chamados ascomas. É um fungo

com crescimento rápido com textura cotonosa de cores verde-oliva a preto (RODRIGUES-HEERKLOTZ; PFENNING, 2007). No estudo de Silva (2017) a linhagem *Chaetomium globosum* (CBMAI xxx) apontou possuir alta taxa antioxidante. Em outros estudos já mostrou capacidade para degradar polietileno crescendo nesse substrato como única fonte de carbono, segundo Sowmya et al. (2014). As “chaetoglobosinas” produzidas por este fungo mostraram atividade antifúngica contra dois fitopatógenos importantes: *Rhizopus stolonifer* e *Coniella diplodiella* (ZHANG et al., 2013).

Saccharomyces é um gênero pertencente ao filo Ascomycota com muita relevância para fabricação de alimentos. Geralmente, as colônias crescem rápido e tomam uma forma circular de coloração esbranquiçada brilhante e textura cremosa. Além de sua participação na produção de pães, vinhos e cerveja, *S. cerevisiae* está envolvida em alguns estudos sobre capacidade de controlar doenças em plantas pelo fato de conseguir sintetizar compostos antibióticos (PICCININ et al., 2005)

A levedura *Rhodotorula*, filo Basidiomycota pertencente à família Sporidiobolaceae, é comumente encontrada no ambiente. É um gênero de leveduras pigmentadas geralmente com coloração alaranjada e textura cremosa. Há relatos na literatura de que *R. mucilaginosa* obteve β -caroteno a partir de subprodutos industriais, o que seria importante na redução de custos da produção (SCHUELER et al., 2014) e ainda é capaz de produzir pentoses, de acordo com Souza (2015).

O gênero *Bacillus* do filo Firmicutes representa bactérias gram-positivas com formato de bastonete. *Bacillus aryabattai* demonstrou ser uma bactéria resistente ao estresse oxidativo e por este motivo, no estudo de Parker et al. (2017) pode ser uma valiosa ferramenta para incorporação em biofertilizantes, além de provocar melhorias no solo e promover o crescimento da planta hospedeira.

As bactérias do gênero *Sphingomonas*, formam um grupo de bastonetes gram-negativos com crescimento lento que resultam em colônias pequenas de cor amarelada. De um modo geral, estão associadas em aplicações biotecnológicas e de bioremediação. No estudo de Khan et al (2014), bactérias do gênero produziram giberelinas ativas e álcool indol acético. Tomates inoculados com *Sphingomonas* tiveram crescimento significativamente elevado, concluindo que algumas cepas contribuem para o crescimento da planta.

Mediante as diferenças de características e de toda essa importância prática é ideal que estas e outras linhagens sigam depositadas em coleções de culturas com técnicas de preservação adequadas para sua manutenção.

2.2 Preservação de micro-organismos

O sucesso da aplicação biotecnológica de uma linhagem depende significativamente das suas condições de conservação. Uma manutenção adequada garante a viabilidade e a pureza da cultura, além de conservar seu estado original evitando mutações indesejadas ao longo do tempo (OKAFOR, 2007).

De acordo com Sola et al. (2012), é preciso realizar uma análise crítica dos prós e contras antes de eleger o método de preservação a ser utilizado. São diversas as técnicas disponíveis e a escolha deve ser pautada nas características do micro-organismo, na infraestrutura do laboratório e na capacitação dos recursos humanos. A técnica de repique contínuo, por exemplo, é financeiramente acessível, mas envolve grande mão-de-obra e alto risco de contaminação cruzada, mostrando-se inadequada e dando lugar a outras que oferecem preservação por longos períodos e maior pureza (ABREU; TUTUNJI, 2004).

A criopreservação consiste em preservar materiais em baixas temperaturas (sendo -20°C a -80°C em freezers ou ultracongelamento em temperaturas de -150°C até -196°C em nitrogênio líquido). Ambas as formas são consideradas muito eficientes em termos de viabilidade celular, porém no caso dos freezers é necessário um controle assíduo da temperatura, uma vez que pode haver oscilações e até mesmo quedas de energia (WOLFE e BRYANT, 2001). O nitrogênio líquido é uma técnica muito custosa, o que limitaria o escopo de trabalho de uma coleção de serviços, por exemplo. A principal desvantagem de ambas as técnicas é em relação ao transporte e armazenamento dos preservados, que exigiria cuidados específicos em relação ao controle da temperatura.

A técnica de preservação em água destilada estéril, também conhecida como Castellani, é muito utilizada, principalmente para manutenção de fungos filamentosos e zoospóricos (PIMENTEL E FIGUEIREDO, 1989). Basicamente consiste em transferir pedaços de inóculo a partir de meio sólido para um frasco (geralmente 2R) contendo água destilada esterilizada, com posterior armazenamento em temperatura ambiente. É uma técnica de baixo custo, simples armazenamento e transporte e fácil reprodutibilidade, porém, com alto risco de contaminação cruzada e necessidade de maior espaço físico para armazenamento.

A liofilização ou “congelamento a seco” é uma das metodologias melhor difundidas em literatura para a maioria das espécies microbianas (COSTA; FERREIRA, 1991). Atende a necessidade de preservação duradoura, existindo relatos de preservados com 40 anos de estocagem. Tem sido muito empregada na rotina de profissionais da academia e indústria (CANHOS et al., 2004). Sua desvantagem, sobretudo, está ligada a fatores financeiros, uma vez que a técnica é custosa em relação a manutenções do equipamento e insumos envolvidos no processo, e também, em termos de eficácia, sabe-se que a técnica não é ideal para preservar algas e protozoários, assim como células ou esporos muito grandes. Além disso, é necessário ter mão de obra especializada e bem treinada para executar a técnica.

2.2.1 Liofilização e suas etapas

Em termos técnicos, o material biológico a ser liofilizado passa por três etapas, a saber: congelamento, secagem primária e secagem secundária (CHRIST, 2010). Essas fases ocorrem em condições especiais de tempo, temperatura e pressão (consideradas as variáveis do processo) que implicam na mudança do estado sólido para o gasoso sem que haja passagem pelo estado líquido, conhecido como sublimação (GARCIA, 2009).

A etapa de congelamento é crucial para o sucesso do processo sendo esta condição variada de acordo com a velocidade de tempo na qual o congelamento é realizado. Um congelamento rápido do material biológico pode resultar em cristais de gelo com poros e fissuras pequenas, o que dificulta a passagem do solvente (água) por seus interstícios, resultando em aumento de duração da etapa de secagem. O contrário pode favorecer o processo de passagem do solvente resultando em economia de tempo (CHRIST, 2010).

A viabilidade celular durante a etapa de congelamento está totalmente ligada ao uso do crioprotetor, que atuará envolvendo as células para que sofram menos com a dessecação e assim, sobrevivam a este estágio. Existem muitas opções de crioprotetores no mercado, porém o uso do *skim milk* 10% é recomendado pela capacidade das proteínas do leite envolverem as células de forma a tornar as taxas de reativação maiores (KING; SU, 1993; PALMFELDT, 2003).

Na etapa de secagem primária a água é removida mediante a passagem direta do estado sólido para o estado gasoso sob condições de temperatura e pressão. Como este processo necessita de energia para ocorrer, parte do calor é proveniente do próprio material biológico e outra parte é oriunda do aquecimento gradual da prateleira do liofilizador em torno de 20°C a 22°C (ORDÓÑEZ, 2005).

O vácuo é um parâmetro de grande importância, sendo capaz de moderar a duração da secagem. Os valores a serem trabalhados dependerão do tipo de equipamento utilizado, porém, dentro do estabelecido pelo manual do mesmo sabe-se que em uma condição ideal, recomenda-se que sua pressão tenha um valor moderado, pois ao utilizar um valor muito baixo o material pode descongelar, e se o valor for elevado pode levar o recongelamento da amostra, o que implicaria em maior tempo de sublimação. O valor de vácuo também deve ser ajustado de acordo com o tipo de amostra a ser liofilizada, sendo geralmente, este, apontado pelo manual do próprio equipamento.

A secagem secundária é considerada opcional, pois seu objetivo é remover a água residual da amostra, logo, deve-se levar em conta a quantidade de inóculo contido no frasco e o tempo de secagem primária para optar em realizá-la. Além disso, não realizar esta etapa pode reduzir ainda mais o tempo total do processo, mas, caso seja necessário, recomenda-se que seja realizada na menor pressão de vácuo possível de acordo com a capacidade do equipamento, a fim de promover a extração da fina camada de moléculas de solvente nos poros da superfície (GARCIA, 2009).

Essas informações são fundamentais para a elaboração de um protocolo, portanto, uma capacitação técnica de alto nível do operador é imprescindível. Percebe-se que a liofilização não é um processo elementar e que envolve muitas variáveis, portanto é necessário que a metodologia de otimização contemple esses fatores para que haja sucesso.

2.3 Delineamento experimental x Otimização do processo de liofilização

Proposta inicialmente em 1950 por Box, a metodologia de planejamento fatorial é pautada na teoria estatística e permite a concessão de informações seguras sobre o processo, fazendo com que técnicas empíricas como as de tentativa e erro fossem deixadas de lado. O crescimento da indústria trouxe consigo a necessidade de agregar metodologias científicas para o desenvolvimento e o aumento da qualidade de processos e produtos, o que gerou competitividade de mercado. Assim, o aprimoramento e a otimização dessas técnicas com o auxílio do delineamento experimental, tornaram-se primordiais para redução dos altos custos envolvidos. (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Em um experimento onde a influência das variáveis sobre as respostas precisa ser determinada recomenda-se o respaldo de um planejamento experimental. Suas vantagens são inúmeras, dentre elas: redução do número de repetições dos experimentos resultando em diminuição de trabalho, tempo e custo; possibilidade de análise de vários

fatores simultaneamente; possibilidade de otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo; capacidade de calcular e avaliar erros experimentais apontando o nível de confiança estatística (BUTTON, 2005).

Primeiramente, é de extrema importância que o profissional que trabalhará com o planejamento saiba mais sobre seu processo do que sobre a estatística propriamente dita. É necessário analisar cautelosamente as variáveis envolvidas, pois a partir delas será montada a matriz de ensaios, que é precursora dos resultados do protocolo otimizado (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Ainda é importante ressaltar que o planejamento é pautado também em informações e características do equipamento a ser testado, não significando que a otimização cabe a todos os modelos e marcas de liofilizadores, como neste caso.

É importante observar que se houver duas ou mais variáveis de influência envolvidas no processo, o planejamento fatorial é o mais indicado a ser aplicado, pois ele permite incluir em cada ensaio todas as combinações de variáveis para serem testadas Barros et al. (1996). Ao olhar dos praticantes de técnicas empíricas este parece um fato impossível, já que a imagem de manter uma variável e alterar as demais parece mais intrínseca ao processo, porém os resultados são mais seguros desta forma (NEVES et al., 2012).

Logo, justamente por esta gama de informações seguras, a CBMAI decidiu optar por aplicar o planejamento experimental na primeira tentativa de otimização do protocolo de liofilização utilizado pela coleção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Otimizar o protocolo de liofilização, usado na rotina da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI/Unicamp para preservação de culturas microbianas.

3.2 Objetivos específicos

- Testar diferentes protocolos de liofilização elaborados a partir do delineamento experimental, visando redução do tempo do processo;
- Selecionar um protocolo que garanta a viabilidade, pureza e manutenção das características morfológicas para todos os grupos de micro-organismos testados;
- Identificar protocolos específicos por grupo taxonômico;
- Curar as linhagens envolvidas no estudo, mediante autenticação molecular e caracterização morfológica, após preservação pelo protocolo selecionado;
- Observar a resposta das culturas preservadas pelo protocolo otimizado para todos os grupos, após 6 meses de liofilizados.
- Capacitar recursos humanos no domínio da técnica em questão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

As linhagens envolvidas nesta pesquisa fazem parte de uma coleção temática de micro-organismos endofíticos, estruturada com o suporte do projeto FAPESP –2015 – 02395-8: “Diversidade e produção de compostos bioativos de micro-organismos endofíticos associados à *Passiflora incarnata*”. Foram selecionadas com base em dois critérios: 1. Características distintas representando a diversidade de metabolismos e formas; 2. Táxons produtores de compostos bioativos, com importância em setores da indústria e agronegócio, conforme supracitado (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens selecionadas para o estudo.

Grupo	Táxon/linhagem	Classificação taxonômica	Característica	Meio de cultivo
Fungo Filamentoso	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (CBMAI 2261)	Ascomycota Hypocreales	Alta esporulação	BDA – Ágar Dextrose Batata
	<i>Chaetomium globosum</i> (CBMAI 2139)	Ascomycota Sordariales	Esporulação moderada	MA2% - Extrato de Malte
Levedura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CBMAI 957)	Ascomycota Saccharomycetales	Não pigmentada	YMA – Ágar Malte de Levedura
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (LMA 936)	Basidiomycota Sporidiobolales	Pigmentada (laranja)	YMA – Ágar Malte de Levedura
Bactéria	<i>Bacillus aryabhatai</i> (61.1)	Firmicutes Bacillales	Gram positiva	TSA – Ágar Tripton de Soja
	<i>Sphingomonas leidy</i> (CBMAI 2297)	Proteobacteria Sphingomonadales	Gram negativa	TSA – Ágar Tripton de Soja

4.1.1 Viabilidade e pureza e caracterização macro e microscópica dos micro-organismos

Visando garantir a confiabilidade dos testes, a viabilidade e a pureza das culturas utilizadas foram avaliadas antes do início do experimento. Para bactérias e leveduras utilizou-se a técnica de estria por esgotamento em placa de Petri, e após 48 horas foi realizada a coloração de Gram. No caso dos procariontes, objetivou-se confirmar as diferenças na estrutura das paredes celulares (positiva e negativa) e as características morfológicas (bastonetes); para as leveduras o intuito foi de confirmar a microscopia. As culturas também foram checadas macroscopicamente, com o auxílio de

estereomicroscópio (Leica Microsystems) mediante a observação de tamanho, borda, elevação, pigmentação, forma e consistência da biomassa.

No caso dos fungos filamentosos, a viabilidade e pureza foram confirmadas utilizando-se a técnica de cultivo monospórico a partir da cultura em meio sólido, e observação microscópica mediante lâminas a fresco, coradas com azul de Lactofenol (CROUS et al., 2019).

4.1.2 Contagem dos micro-organismos

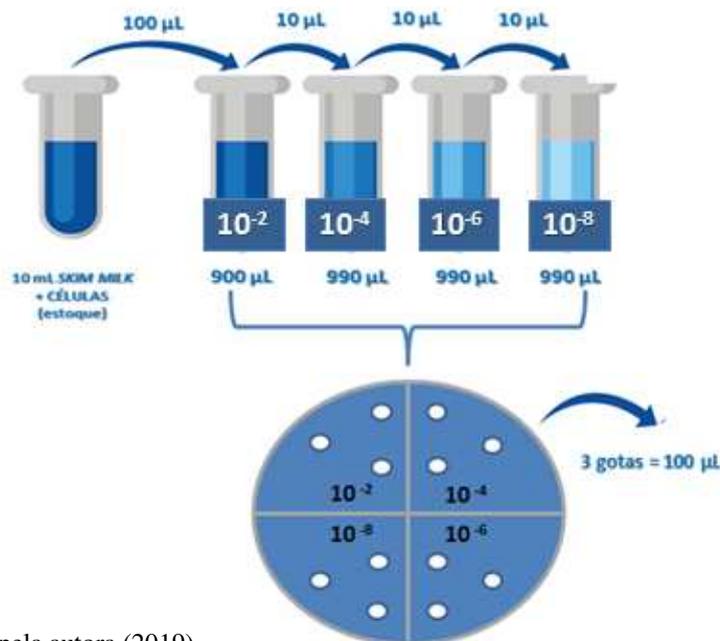
Dois métodos foram utilizados para quantificar os inóculos utilizados, pré e pós-ensaios: 1. Para as espécies unicelulares (bactérias e leveduras), utilizou-se a metodologia de gotas em ágar 0,1% de acordo com Hunter e Belt (2003) e Kirsop e Doyle (1991); 2. As unidades formadoras de fungos filamentosos foram anotadas através da técnica de semeadura por espalhamento (com alça de Drigalski). Em ambos os casos foram realizadas diluições em série: as bactérias e leveduras diluídas em ágar 0,1% e os fungos filamentosos em água destilada esterilizada.

No preparo da suspensão das células com o crioprotetor (*Skim Milk* Difco™ BD) foi utilizado um volume total de 10 mL em placa de Petri. O método da contagem em gotas de ágar consistiu na diluição dessa suspensão em microtubos, sendo o tubo inicial com 900 µL de ágar 0,1% e os demais com 990 µL, conforme ilustra a Figura 1.

Com o auxílio da micropipeta, 100 µL da suspensão de células em *Skim Milk* foram transferidos para o tubo contendo 900 µL e a partir deste, 10 µL foram transferidos de forma seriada aos demais. Após, 100 µL de cada diluição foram retirados e plaqueados na marcação correspondente na placa de Petri, sendo divididos em três gotas (Figura 1).

Para fungos filamentosos foi realizada a diluição dessa mesma forma, porém em água destilada esterilizada e transferidos 100 µL para uma placa contendo meio de cultivo específico para cada linhagem e semeado com o auxílio da alça de Drigalski.

Nos dois casos as placas foram encubadas em BOD à 28°C e observadas após 48 horas.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 1. Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e leveduras, pela técnica de gotas em ágar 0,1%.

4.1.3 Fotodocumentação dos micro-organismos

Para avaliar se as características macroscópicas das culturas estudadas e seu tempo de crescimento haviam se mantido após os ensaios otimizados, as culturas liofilizadas foram reativadas, observadas e fotodocumentadas. O tempo de crescimento esperado para as bactérias e leveduras foi de até 48 horas e para fungos filamentosos de até 7 dias. Caso houvesse alguma alteração nestes parâmetros supracitados o ensaio seria classificado como insatisfatório.

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Montagem do planejamento

O delineamento foi pensado e elaborado a partir dos dados do protocolo CBMAI original, discutido entre o representante técnico do equipamento e diversos pesquisadores; doravante este será denominado protocolo padrão, Tabela 2. Após o estudo do processo e do manual do equipamento foram elencadas as quatro variáveis envolvidas, conforme aponta a Tabela 3, sendo: 1. Tempo de congelamento; 2. Temperatura de Congelamento; 3. Tempo de secagem; 4. Volume de inóculo no frasco. O valor de vácuo aplicado no processo não variou, pois é uma condição pré-determinada pelo equipamento, de acordo com instruções do manual de operação. A

etapa de secagem secundária, considerada opcional pelo fabricante em função do baixo volume a ser liofilizado (entre 300-1000 μL), não foi incluída nos ensaios do delineamento.

Tabela 2. Protocolo CBMAI adotado no estudo como “Protocolo padrão”.

Inóculo	Etapa	Temperatura	Duração	Vácuo
	<i>Loading</i>	+20°C		
	<i>Freezing</i>	-25°C	3:00	
	<i>Freezing</i>	-25°C	0:30	
400 μL	<i>main drying</i>	-25°C	0:05	0.120
	<i>main drying</i>	-10°C	10:00	0.120
	<i>main drying</i>	10°C	15:00	0.120
	<i>main drying</i>	20°C	5:00	0.120
	<i>final drying</i>	20°C	0:05	0.030
	<i>final drying</i>	25°C	5:00	0.030
	Total		38h40min	

Tabela 3. Tabela de níveis das variáveis do processo.

Código	Fatores	Unidade	-1	0	1
x1	Quantidade de inóculo	μL	300	650	1000
x2	Temperatura de congelamento	°C	-30	-25	-20
x3	Tempo de congelamento	h	3	3,5	4
x4	Tempo de secagem	h	5	10	15

Logo, definida as variáveis em estudo, o delineamento mais adequado para trabalhar foi o Fracionado 2^{4-1} com 3 Pontos Centrais, conforme indica a Tabela 4. Foram gerados oito ensaios, sendo o ponto central o ensaio de número 9, que funcionou como um controle de qualidade da reprodutibilidade dos ensaios, uma vez que o delineamento visa reduzir a quantidade de repetições. Ele foi realizado em três momentos: no início dos testes, no meio e no final. Esses dados estão apontados na Tabela 5.

Tabela 4. Aplicação da tabela de níveis na matriz dos ensaios.

Ensaio	x1				x2		x3	x4
	x1	x2	x3	x4	Quant. de inóculo (espessura) (μL)	Temperatura de congelamento ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de congelamento (h)	Tempo de secagem (h)
1	-1	-1	-1	-1	300	-30	3	5
2	1	-1	-1	1	1000	-30	3	15
3	-1	1	-1	1	300	-20	3	15
4	1	1	-1	-1	1000	-20	3	5
5	-1	-1	1	1	300	-30	4	15
6	1	-1	1	-1	1000	-30	4	5
7	-1	1	1	-1	300	-20	4	5
8	1	1	1	1	1000	-20	4	15
9	0	0	0	0	650	-25	3,5	10

Tabela 5. Ensaios gerados pelo Delineamento Fracionado $2^{4-1} + 3\text{P.C.}$

Ensaio	Inóculo (μL)	T $^{\circ}\text{C}$ de congelamento	Tempo de congelamento	Tempo de secagem	Vácuo (mbar)	Duração (horas)
1	300	-30 $^{\circ}\text{C}$	3h	5h	0.120	08h05
2	1000	-30 $^{\circ}\text{C}$	3h	15h		18h05
3	300	-20 $^{\circ}\text{C}$	3h	15h		18h05
4	1000	-20 $^{\circ}\text{C}$	3h	5h		08h05
5	300	-30 $^{\circ}\text{C}$	4h	15h		19h05
6	1000	-30 $^{\circ}\text{C}$	4h	5h		09h05
7	300	-20 $^{\circ}\text{C}$	4h	5h		09h05
8	1000	-20 $^{\circ}\text{C}$	4h	15h		19h05
9	650	-25 $^{\circ}\text{C}$	3h30	10h		13h55

4.2.2 Forma de análise dos resultados do delineamento

A análise dos resultados foi realizada com o auxílio do software *Protimiza Experimental Design*, para indicar os efeitos que as variáveis tiveram sob cada ensaio.

Os principais critérios definidos para classificar um ensaio como “satisfatório” foram: 1. Manter a contagem celular pós-liofilização semelhante à inicial; 2. Preservar as características macro e microscópicas de acordo com o observado inicialmente, respeitando o tempo de crescimento das colônias, inclusive.

Além da análise de variância, foi calculada a perda de viabilidade celular em relação aos ensaios, comparado com a média do protocolo padrão, através dos dados da contagem pré e pós-liofilização. O principal critério de avaliação foi a estabilidade da contagem no mesmo ciclo logarítmico. Exemplificando, o ensaio foi considerado

satisfatório, sem perda da viabilidade celular, se na contagem pré o resultado foi $X.10^8$ e na contagem pós o resultado foi $Y.10^8$.

Logo, os ensaios considerados satisfatórios em relação a todos os critérios supracitados foram submetidos a um teste validativo. Esta etapa consistiu em repetir os ensaios em triplicatas exatamente na mesma condição anterior para checar a reprodutibilidade dos resultados.

As médias dos ensaios validados foram comparadas com a média do protocolo padrão, visando avaliar a uniformidade dos dados. Para isto, foi feito o cálculo do desvio padrão das médias, onde se lê: valores baixos de desvios (próximos de zero) significam que os dados do conjunto estão mais próximos da média (NOVAES, 2015).

A confiabilidade dos resultados acima pôde ser corroborada através da análise de Tukey (1953), também conhecido como teste de Tukey da diferença honestamente significativa (HSD – Honestly Significant Difference). Essa análise definiu a menor diferença significativa entre as médias dos ensaios otimizados e do protocolo padrão.

4.3 Liofilização

4.3.1 O equipamento

O liofilizador utilizado pela CBMAI é da marca alemã Christ. Abaixo, seguem as especificações básicas do equipamento ilustradas pelas Figuras 2 e 3.

1. Liofilizador Christ – modelo Gamma 2-16 LSC e Bomba de vácuo Vaccubrand – modelo RZ6.

Todas as etapas – congelamento, secagem primária e fechamento dos frascos 2R, foram realizadas dentro do próprio equipamento, restando apenas a lacração manual com lacre de alumínio.

O liofilizador possui 2 prateleiras compostas por 2 termoblocos cada, com capacidade total de liofilizar 188 frascos 2R. As prateleiras congelam de forma indireta e para as etapas de secagem utiliza o calor do próprio material para elevar sua temperatura até a mais próxima do ambiente (em torno de 20 a 25°C)



Fonte: autora (2018)

Figura 2. Liofilizador Christ.



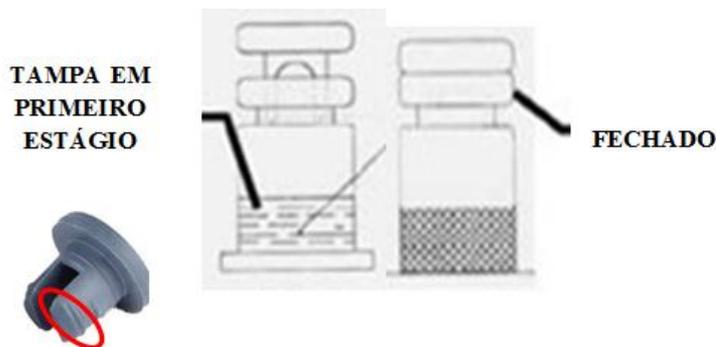
Fonte: autora (2018)

Figura 3. Bomba de vácuo utilizada no processo.

4.3.2 Preparo das amostras microbianas

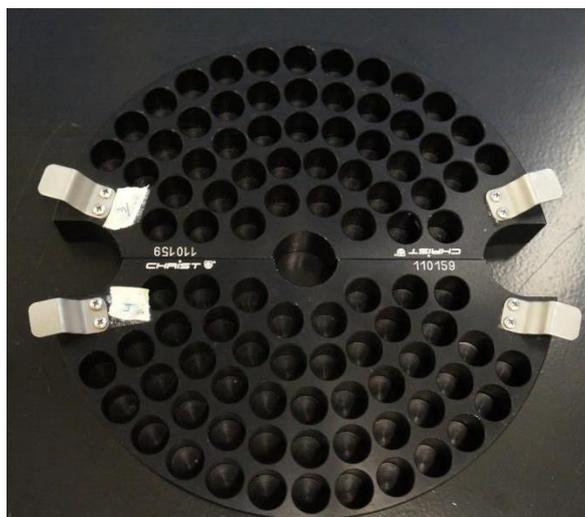
O Crioprotetor eleito para o estudo foi o mesmo utilizado pela CBMAI em sua rotina, o *Skim Milk* (Difco™ BD) – Leite desnatado 10%. Para cada linhagem estudada foi utilizado um volume de 10 mL dessa solução, que após preparada, foi homogeneizada em agitador magnético e autoclavada por 6 minutos à 121°C.

Todo o procedimento foi realizado sob condições assépticas, em uma câmara de fluxo laminar (Veco – Bio Seg 12) . Diferentes volumes de inóculo foram testados: 300 μ L, 650 μ L e 1000 μ L. Os frascos foram tampados até o primeiro estágio da tampa de borracha (Figura 4) e colocados no termobloco do liofilizador, conforme a Figura 5. Após o término da preservação os frascos foram reservados em geladeira a 4-6 graus C°.



Fonte: elaborado pela autora (2020)

Figura 4. Demonstração do frasco 2R com tampa de borracha em primeiro estágio.



Fonte: autora (2018)

Figura 5. Termobloco utilizado para acoplar os frascos dentro do liofilizador.

4.3.3 Reativação das amostras após liofilização

Após o processo de liofilização os frascos em triplicatas selecionados para reativação foram retirados da geladeira e abertos em câmara de fluxo laminar. Cada linhagem foi reidratada com 10 mL do caldo de cultivo recomendado para cada espécie. Os frascos foram homogeneizados e ficaram em repouso por 20 minutos para

completa hidratação. Após, o processo de preparação da contagem pós-lioofilização foi realizado e as placas foram incubadas respeitando o tempo de crescimento de cada linhagem.

4.4 Autenticação molecular dos isolados

4.4.1 Extração do DNA genômico

A confirmação da identidade das linhagens estudadas foi realizada pela técnica de sequenciamento do DNAr, utilizando-se o protocolo proposto por Aamir et al. (2015), modificado. As seis linhagens foram cultivadas em meio sólido adequado para cada uma (Tabela 1). Os inóculos foram transferidos para um tubo de 2,0 mL contendo esferas de vidro para lise mecânica e 800 µL de solução de extração com fenol. Após serem agitados em vórtex, os tubos ficaram em banho-maria a 65°C por 20 minutos, sendo novamente agitados e então centrifugados a 16.000 g por 5 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado 1 volume de fenol e novamente centrifugado a 16.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante desta etapa recebeu 1 volume de fenol e 1 volume de clorofórmio (1:1) e foi levado à centrifugação nas mesmas condições anteriores. Esta etapa foi repetida, porém adicionando 1 volume de clorofórmio. O volume restante recebeu 600 µL de isopropanol e ficou no freezer por 20 minutos. O conteúdo foi centrifugado a 16.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 100 µL de etanol 70%. O material foi centrifugado a 16.000 g por 2 minutos a 4°C e descartado. Após a completa evaporação do etanol 70% (*overnight*) foram adicionados 40 µL de água MilliQ. A integridade e a concentração do DNA após extração foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR™ Safe. O padrão de concentração utilizado foi o DNA genômico do fago lambda e a visualização ocorreu em fotodocumentador sob luz UV.

4.4.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e purificação dos produtos de PCR

O DNA obtido foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos fragmentos das regiões mais adequadas para cada micro-organismo conforme a Tabela 6. Os produtos de PCR foram visualizados em fotodocumentador através de eletroforese em gel de agarose e foram purificados utilizando o kit GFX™ PCR DNA e Gel Brand Purification (GE Health Care) de acordo com as orientações do fabricante.

Tabela 6. Primers e suas condições de amplificação.

Linhagem	Primer	Referência	Região	Condição
<i>B. aryabhatai</i>	10f e 1100r	(YESQUÉN, 2018)	DNAr 16S	
<i>S. leidyi</i>	10f e 1100r	(GOULART, 2019)	DNAr 16S	
<i>R. mucilaginosa</i>	NL1 e NL4	(SANTOS, 2013)	DNA 26S	94°-2 * 30x
<i>S. cerevisiae</i>	NL1 e NL4	(SANTOS, 2013)	DNA 26S	(94°-1', 55°-1', 72°-3') * 72°-
<i>T. longibrachiatum</i>	1018f e 1620r	(SILVA, 2017)	TEF	3'; 4°-∞
<i>C. globosum</i>	ITS1 e ITS4	(SILVA, 2017)	ITS	

4.4.3 Sequenciamento dos produtos da PCR

A reação de sequenciamento ocorreu em placa com 96 poços compatível com o sequenciador ABI3500 XL (Applied Biosystems). A quantidade de DNA utilizada variou de acordo com o tamanho do fragmento da PCR de cada amostra. Para cada primer utilizado foi preparado um *mix* com reagentes indicados na Tabela 7. O volume por reação foi multiplicado pela quantidade de amostra que foram sequenciadas com o mesmo primer.

Tabela 7. Reagentes e volume para reação de sequenciamento.

Reagentes	Volume por reação (10 µL)
Tampão Save Money	2 µL
Primer (5 µM) ¹	0,5 µL
Big DYE (Life Technologies)	0,5 µL
DNA (10-20 ng/ µL) ²	2 µL
Água MilliQ	5 µL
Volume total	10 µL

¹ Os primers utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos usados na Reação de PCR, porém diluídos a partir da solução estoque no momento do uso.

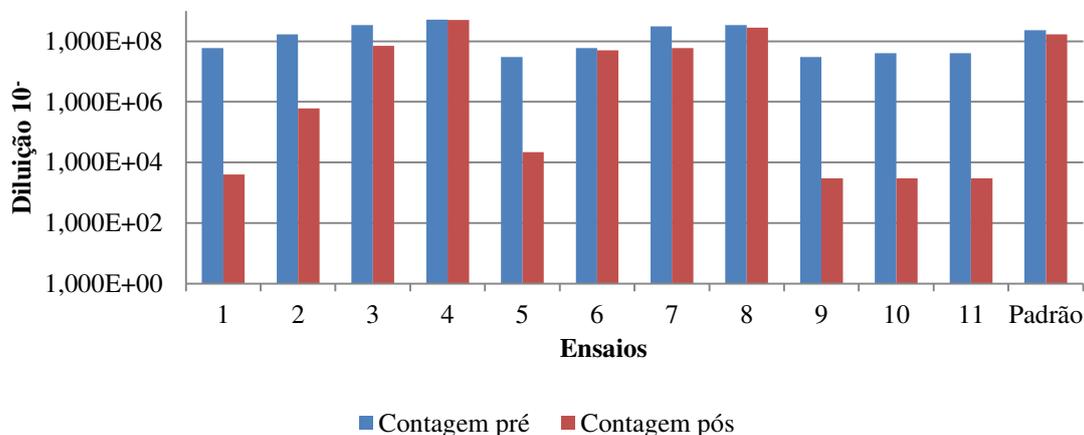
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade celular pré e pós-liofilização dos ensaios otimizados

5.1.1 Fungos Filamentosos

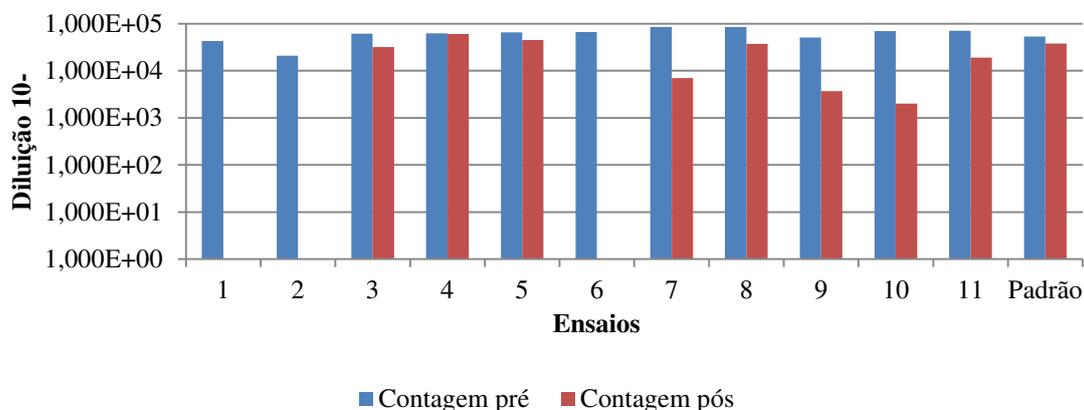
Os resultados da contagem dos fungos filamentosos *T. longibrachiatum* e *C. globosum* estão expressos nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Considerando a importância de se obter um protocolo capaz de manter a boa viabilidade celular, os ensaios que apresentaram melhores resultados para este grupo foram: *T.*

longibrachiatum – ensaios 3, 4, 6, 7 e 8 (Tabela 3); *C. globosum* – ensaios 3, 4, 5 e 8 (Tabela 3). Levando-se em conta o interesse por um protocolo robusto, os ensaios 4 (com duração de 08h05 min) e 8 (com duração de 19h05min) foram satisfatórios para ambas as linhagens, e também são os que mais se assemelham ao protocolo padrão.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 6. Contagem pré e pós-liofilização para *T. longibrachiatum* de todos os ensaios realizados e ensaio padrão.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 7. Contagem pré e pós-liofilização para *C. globosum* de todos os ensaios realizados e ensaio padrão.

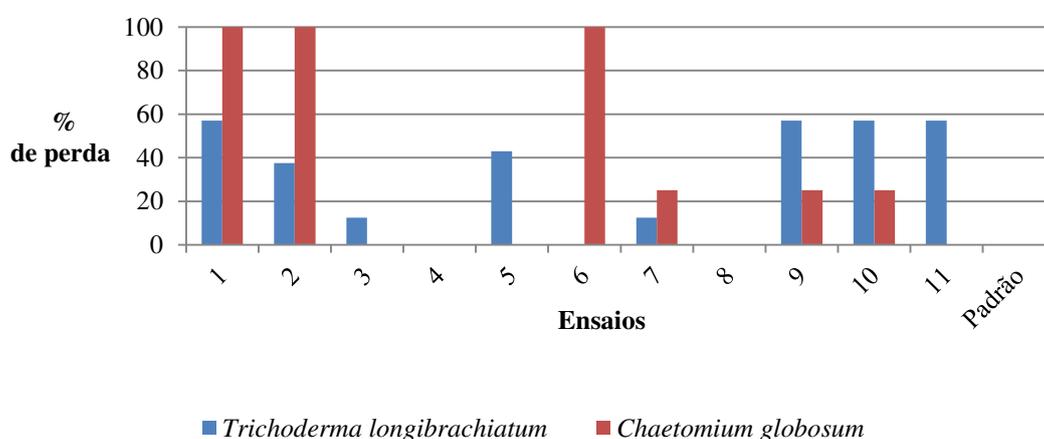
Alguns ensaios se mostraram insatisfatórios em relação a viabilidade celular. Em todo tipo de preservação, é esperado que haja perda celular, inclusive na liofilização pois há etapas capazes de injuriar a célula (Dellaretti, 2014). Apesar de não ser esperado, uma perda de viabilidade próxima de 100% foi registrada nos ensaios 1, 2 e 6 para a cultura de *C. globosum*, onde a contagem pós-liofilização foi $<10^1$ UFC/mL. *T. longibrachiatum* apresentou em alguns ensaios perdas significativas, mas com algum

crescimento em todas as contagens pós-preservação, talvez justificado pelo fato de ser um fungo com alta esporulação.

O ensaio 3 apresentou sensível perda para a linhagem *T. longibrachiatum* e bons resultados para *C. globosum* e no ensaio 6 ocorreu o contrário, logo, esses protocolos podem ser classificados como intermediários para as respectivas linhagens para não serem inviabilizados.

Morgan et al. (2006) e Prakash et al. (2012) afirmam que a concentração inicial desejada para garantir uma boa recuperação pós-liofilização deve ser superior a 10^8 UFC/mL. Para algumas espécies como *C. globosum* que produz esporos sexuais maiores, porém em menor quantidade, torna-se mais difícil alcançar tal potência. No experimento realizado foi necessário a utilização de 4 a 6 placas de crescimento celular para atingir uma concentração de 10^4 UFC/mL. Em alguns ensaios ela se manteve, indicando que não houve perdas celulares.

O estudo de Dellaretti (2014) indicou que protocolos experimentais de preservação devem apresentar uma taxa de reativação superior a 75%, sendo sempre recomendado que haja a checagem logo após o término da liofilização. A Figura 8 indica a taxa de perda da viabilidade celular logo após a preservação.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 8. Taxa de perda de viabilidade celular para o grupo dos fungos filamentosos pós-ensaios realizados e padrão.

Os resultados mostraram que os ensaios 3, 4 e 8 – que tiveram perda celular abaixo de 25% foram os mais indicados para o grupo dos fungos filamentosos. É fato que algumas características morfológicas das linhagens podem ter interferido para o sucesso da viabilidade. Costa et al. (2009) descreve que fungos filamentosos menos esporulados

podem não suportar as injúrias causadas pela liofilização, porém, como a maioria dos esporos habitualmente possuem menos água do que hifas vegetativas, mesmo sendo uma esporulação moderada já existe vantagem para suportar a dissecação causada pela secagem.

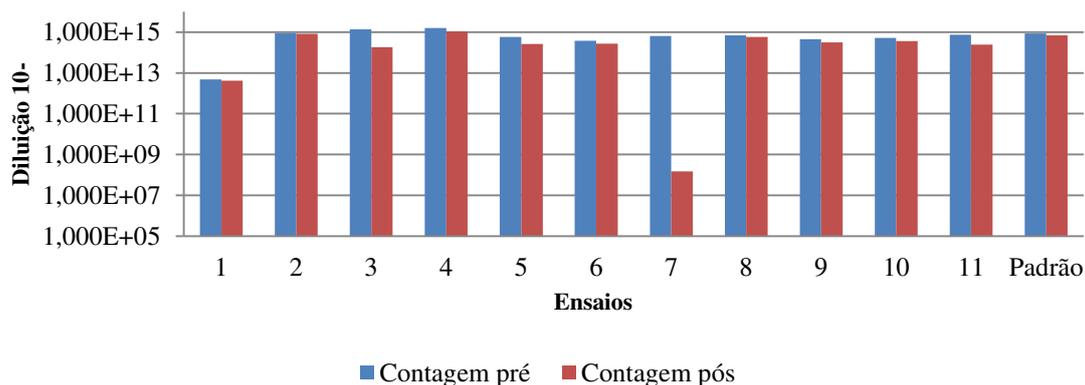
Alguns parâmetros do ensaio também podem ter influenciado negativamente nas perdas de *C. globosum*. Os ensaios 1, 2 e 6, que não obtiveram crescimento pós-reativação (10^{-1} UFC/mL) foram congelados a uma temperatura de -30°C , enquanto nos ensaios bem-sucedidos o congelamento ocorreu à temperatura de -20°C . Embora a análise estatística (item 5.4.1) tenha considerado este fator não significativo, há estudos que sugerem que a linhagem é extremamente sensível a mudanças de temperatura. Um exemplo é que a temperatura de incubação a 35°C é adequada, porém, ao aumentar para 42°C o fungo não apresenta crescimento (OIKAWA 2010).

Os ensaios que foram satisfatórios para *T. longibrachiatum* possivelmente poderiam ser testados ou utilizados para outros representantes de fungos filamentosos com alta taxa de esporulação como *Penicillium* ou *Aspergillus*.

5.1.2 Contagem de viabilidade – Leveduras

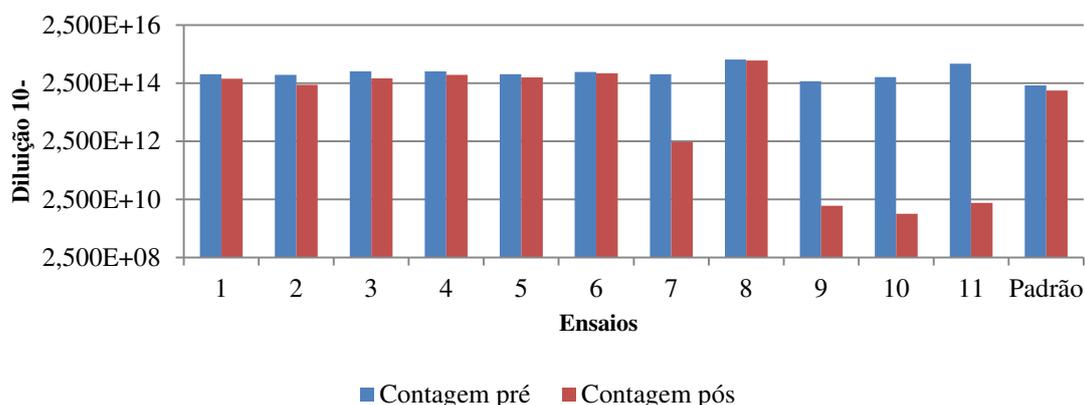
As leveduras responderam melhor na maioria dos ensaios, mesmo sendo considerado que células grandes (podem chegar até 12 micra de comprimento) não têm tanto sucesso na liofilização.

Estudos como os de Alcarde (1996), Abadias et al. (2001) e Santos (2013) evidenciaram que o uso de leite desnatado 10% como agente crioprotetor, tem forte influência na taxa de viabilidade celular pós-liofilização. De modo geral *S. cerevisiae* costuma apresentar baixa recuperação pós-preservação, porém a taxa de sobrevivência é substancialmente mais elevada quando há o uso deste crioprotetor. As Figuras 9 e 10 indicam a contagem pré e pós-liofilização das duas representantes do grupo das leveduras, *S. cerevisiae* e *R. mucilaginosa*, respectivamente.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

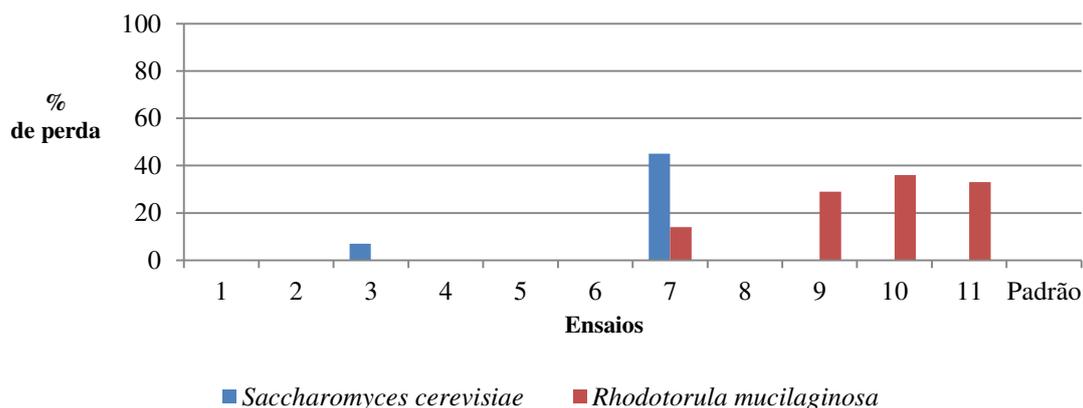
Figura 9. Contagem pré e pós-liofilização para *S. cerevisiae* de todos os ensaios realizados e ensaio padrão.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 10. Contagem pré e pós-liofilização para *R. mucilaginosa* de todos os ensaios realizados e ensaio padrão.

Embora quase todos os ensaios tenham sido satisfatórios, os ensaios 3,4 e 8 também foram eleitos para este grupo para a montagem de um protocolo robusto. Os demais ensaios podem ser realizados eventualmente, já que não tiveram perdas consideráveis de viabilidade conforme ilustra a Figura 11. Porém os três selecionados são os que apresentam melhores tempos de duração de processo, deste modo, são mais vantajosos. Os ensaios selecionados também são próximos ao protocolo padrão.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 11. Taxa de perda de viabilidade celular para o grupo das leveduras pós-ensaios realizados e padrão.

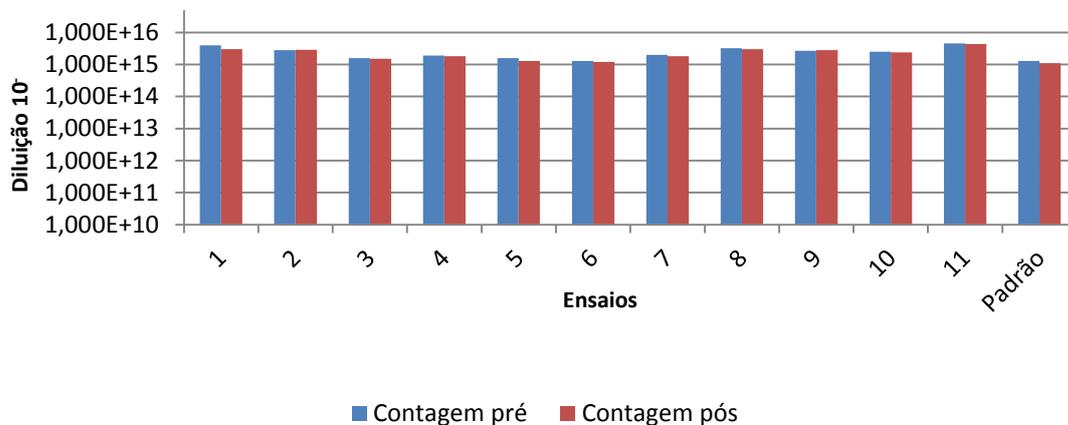
Apesar do ensaio 3 ter apresentado uma pequena queda na viabilidade de *S. cerevisiae* considera-se que o resultado foi satisfatório para a linhagem, não inviabilizando o protocolo. A literatura reporta que de modo geral as leveduras são micro-organismos fáceis de estocar devido à resistência a condições adversas (KIRSOP e SNELL, 1984), suportando bem o processo de liofilização que em alguns casos pode resultar em baixos níveis de sobrevivência e estabilidade celular para alguns grupos. Nossos resultados mostraram que mesmo apresentando células maiores, em geral susceptíveis, as leveduras constituem um grupo onde a liofilização pode ser recomendada.

Vergne e Tutunji et al. (2004) observaram que a temperatura de -20°C para congelamento é adequada para a maioria dos micro-organismos, mas ainda podem haver células sensíveis que não sobreviveriam por longos períodos. No caso das leveduras deste estudo também houve bons resultados para o congelamento a -30°C .

5.1.3 Contagem de viabilidade – Bactérias

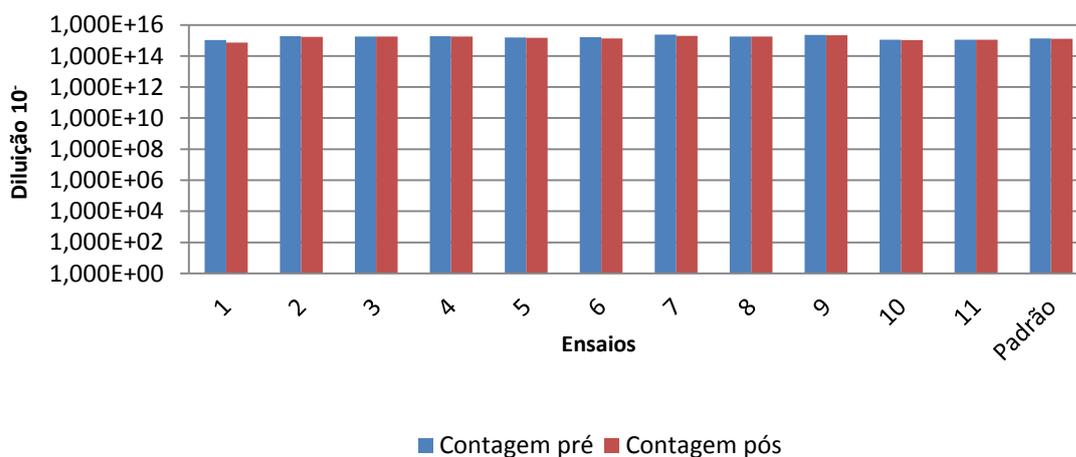
Os ensaios testados foram positivos para o grupo das bactérias. Ambas as espécies apresentaram ótimas condições de viabilidade pós-preservação. O resultado satisfatório já era esperado já que comumente em literatura sobre o assunto lê-se sobre o sucesso da liofilização para o grupo, sendo esta forma de preservação uma atividade rotineira dentro das maiores coleções de distribuição de linhagens do mundo todo. As Figuras 12

e 13 ilustram os dados da contagem de *B. aryabhatai* e *S. leidy* (respectivamente) em todos os ensaios realizados e no protocolo padrão.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 12. Contagem pré e pós-lioofilização para *B. aryabhatai* de todos os ensaios testados e ensaio padrão.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

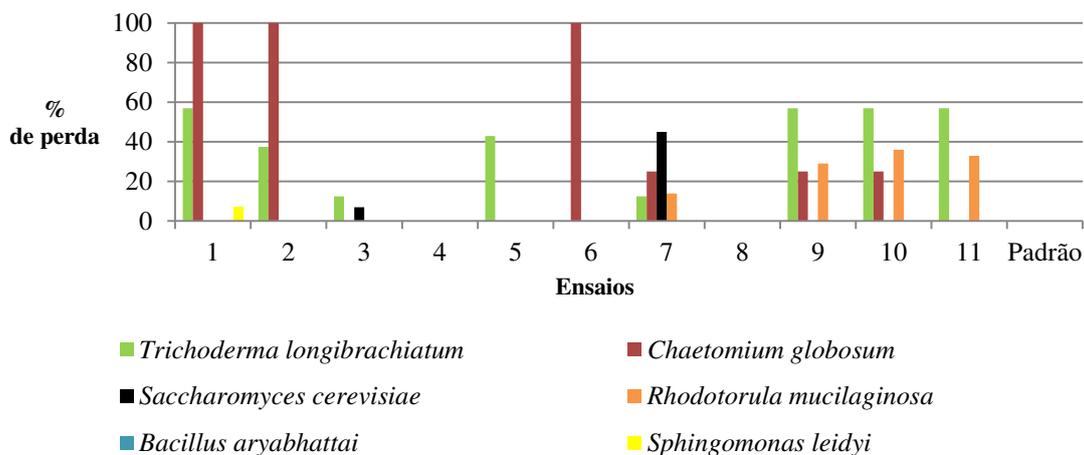
Figura 13. Contagem pré e pós-lioofilização para *S. leidy* de todos os ensaios testados e ensaio padrão.

De um modo geral, os ensaios realizados obtiveram resultados semelhantes ao protocolo padrão, assim para este grupo, poderiam ser utilizados quaisquer um deles. Porém, conforme supracitado os ensaio 3, 4 e 8 foram eleitos para serem validados como os melhores ensaios do delineamento, mas sem inviabilizar o restante. O ensaio 1 apresentou uma ínfima perda para *S.leidy*, porém nada que seja significativa

estatisticamente, sendo assim, então, considerado que para este grupo não houveram perdas celulares.

Myamoto-Shinohara (2008) avaliou a taxa de sobrevivência de bactérias Gram positivas logo após a liofilização e observou que elas tiveram maior índice de sobrevivência do que as Gram negativas, justificando este fato pela diferença de espessura entre as paredes celulares. No presente estudo esta diferença não foi observada, tendo ambos os metabolismos apresentado os melhores resultados dentre todos os grupos testados. O estudo de Prakash et al. (2012) atribui o sucesso da sobrevivência ao material e vedação do frasco / ampola. Segundo suas observações tampas de borracha sem lacres podem permitir a passagem de água e oxigênio afetando a qualidade e viabilidade do preservado, uma vez que o liofilizado é um material higroscópico, ou seja, absorve água.

Para finalizar, a Figura 14 ilustra a perda de viabilidade de todos os micro-organismos apontando o sucesso dos ensaios 3, 4 e 8 selecionados para a validação.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 14. Comparativo da taxa de perda de viabilidade celular para todas as linhagens estudadas pós-ensaios testados e padrão.

Vale ressaltar que os protocolos que não apresentaram perdas para um micro-organismo, mas apresentaram para outro(s) podem ser utilizados pela linhagem na qual ele obteve sucesso, porém para a coleção é mais vantajoso que haja apenas um protocolo capaz de englobar a maioria dos diferentes tipos de metabolismos. A Tabela 8 indica os protocolos específicos para cada linhagem.

Tabela 8. Protocolos otimizados específicos para cada linhagem.

Linhagem	Protocolo	Tempo de duração (respectivamente)
<i>T. longibrachiatum</i>	3,4,6,7,8	18h05min; 08h05min; 09h05min; 09h05min; 19h05min.
<i>C. globosum</i>	3,4,5,8	18h05min; 08h05min; 19h05min; 19h05min.
<i>S. cerevisiae</i>	1,2,3,4,5,6,8,9	08h05min; 18h05min; 18h05min; 08h05min; 19h05min; 09h05min; 19h05min; 13h55min
<i>R. mucilaginosa</i>	1,2,3,4,5,6,8	08h05min; 18h05min; 18h05min; 08h05min; 19h05min; 09h05min; 19h05min.
<i>B. aryabhatai</i>	Todos	08h05min; 18h05min; 18h05min; 08h05min; 19h05min; 09h05min; 09h05min; 19h05min; 13h55min.
<i>S. leidyi</i>	Todos	08h05min; 18h05min; 18h05min; 08h05min; 19h05min; 09h05min; 09h05min; 19h05min; 13h55min.

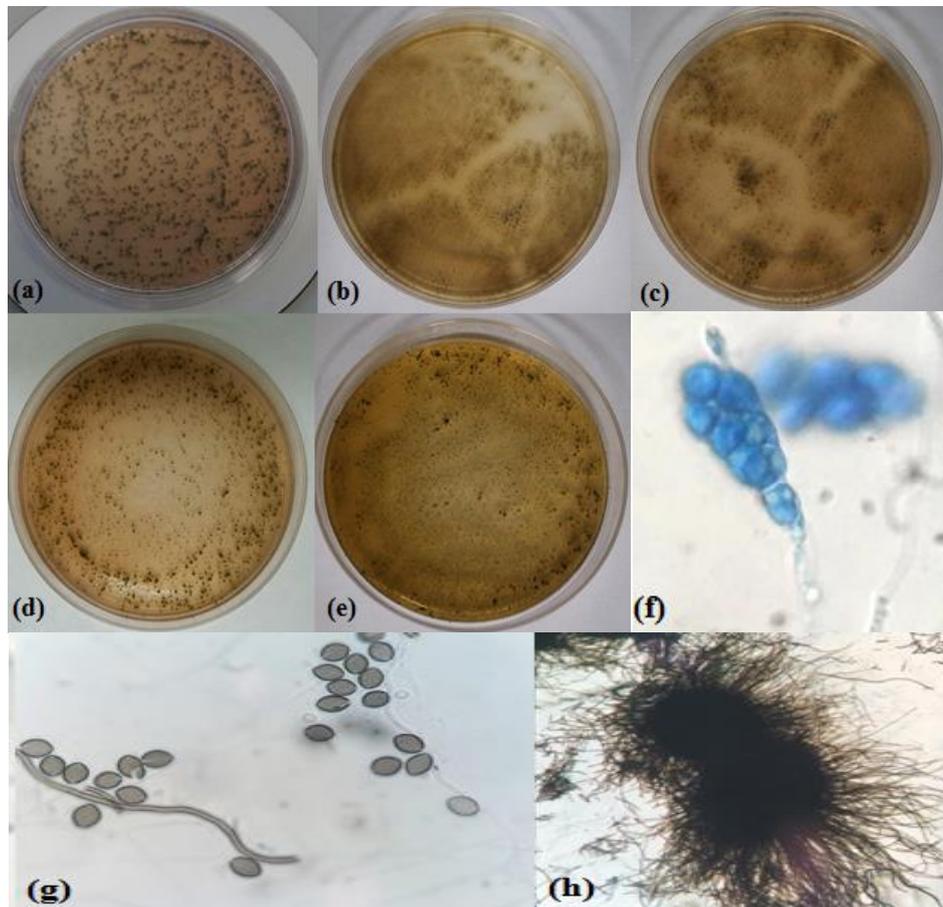
5.2 Características morfológicas das linhagens

5.2.1 Fungos filamentosos

As características morfológicas macro e microscópicas do grupo dos fungos filamentosos pós-ensaios otimizados permaneceram inalteradas, o que já era previsto, pois apesar das técnicas de preservação injuriar as células a ponto de provocar certa perda de viabilidade, os métodos geralmente não alteram a morfologia da célula. O que pode ser esperado é a dificuldade de crescimento pós-preservação. O tipo de crioprotetor usado pode ser um dos motivos de alteração da taxa de crescimento, conforme relatado por Malik (1998). Muitas vezes é necessário mais de um repique para que a cultura volte a crescer em sua normalidade. Esse aspecto, entretanto, não foi observado neste estudo em nenhum dos ensaios testados, mostrando um importante aspecto positivo dos protocolos propostos.

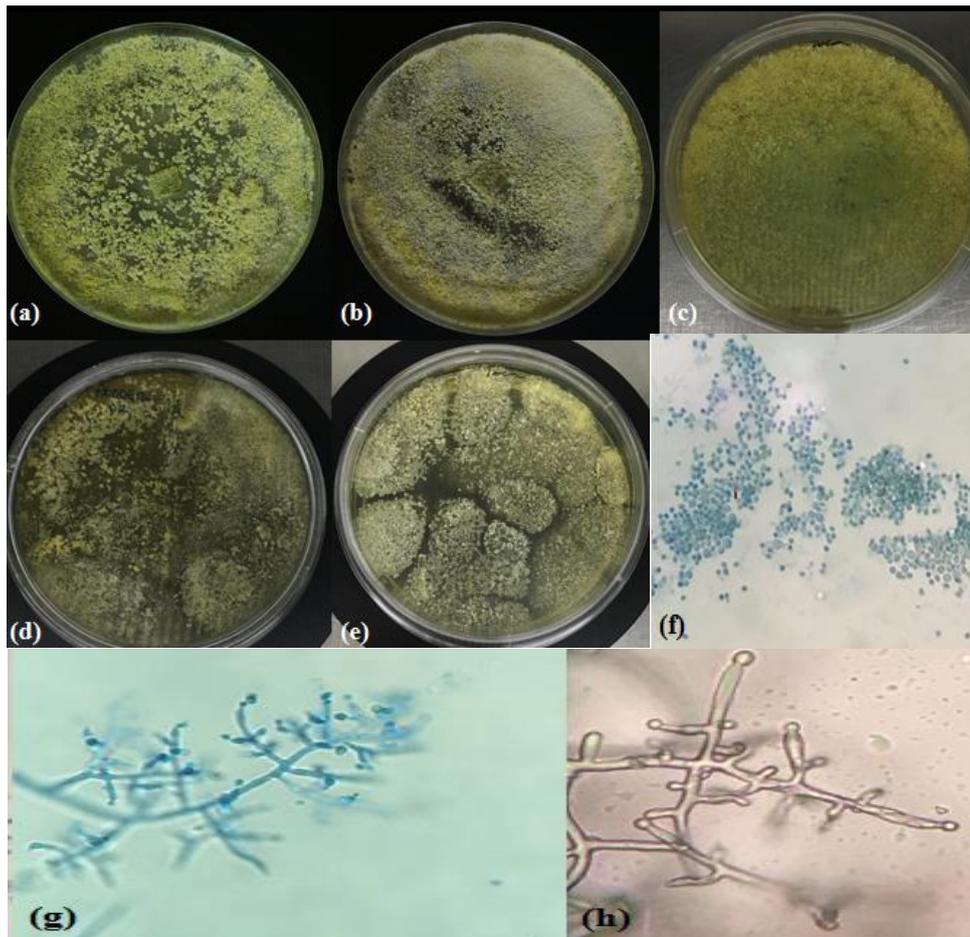
As Figuras 15 e 16 ilustram as características morfológicas macro e microscópicas dos fungos filamentosos *Chaetomium globosum* e *Trichoderma longibrachiatum*

(respectivamente) antes e após os ensaios 3, 4, 8 e padrão. Esta análise foi determinante para julgar se esses ensaios seriam ou não validados.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 15. Características morfológicas de *C. globosum* após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** asco colorido com Azul de Lactofenol (aumento de 1000x). **g** ascósporos limoniformes (400x). **h** ascoma com rizoides basais.

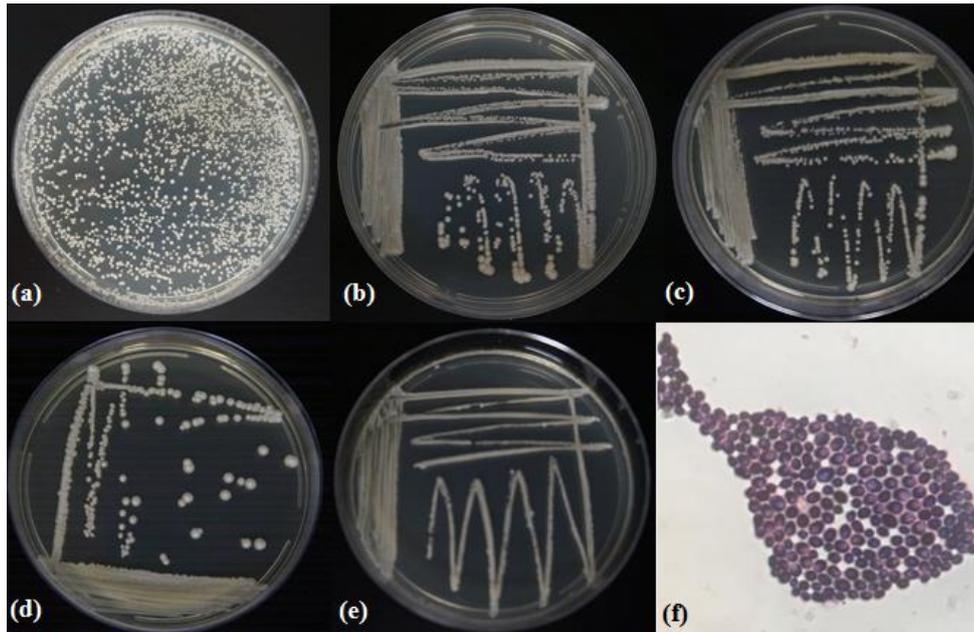


Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 16. Características morfológicas de *T. longibrachiatum* após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** conídios esféricos corados com Azul de Lactofenol (400x). **g e h** estruturas reprodutivas (conídios e fiáldes) - (1000x).

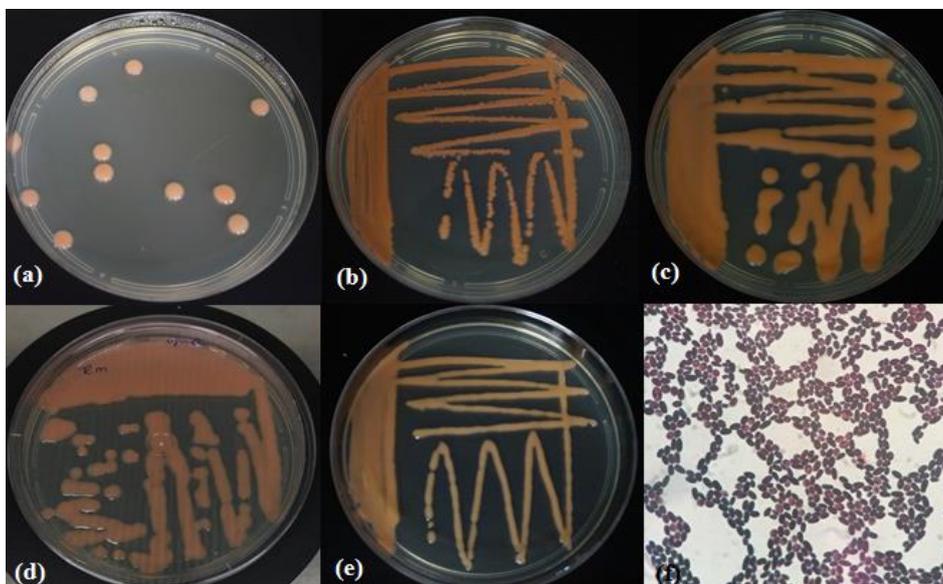
5.2.2 Leveduras

As células leveduriformes também não apresentaram alterações em sua morfologia macro ou microscópica. O tempo de crescimento das colônias permaneceu o mesmo e as características de pigmentação de *R. mucilaginosa* não se mostrou alterada após nenhum ensaio testado. As imagens apresentadas nas Figuras 17 e 18 permitem evidenciar estes dados.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 17. Características morfológicas de *S. cerevisiae* após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento isolado. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** células leveduriformes após coloração de Gram (1000x).

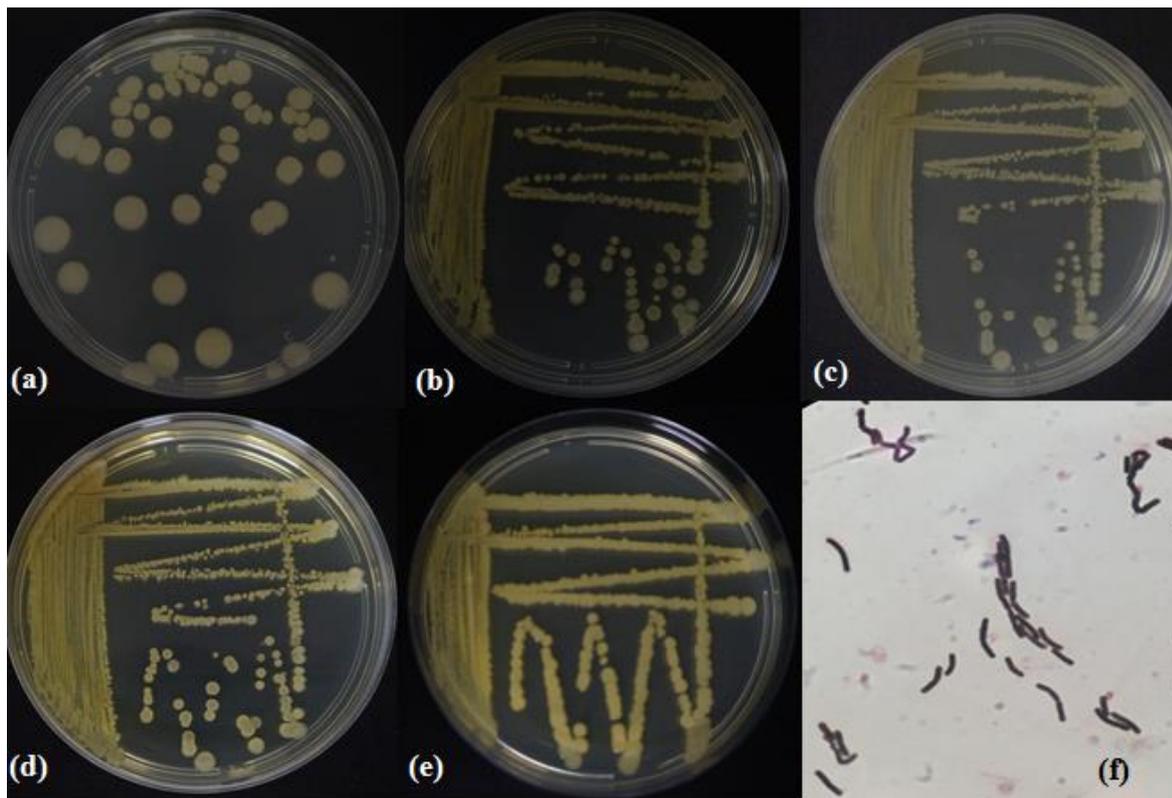


Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 18. Características morfológicas de *R. mucilaginosa* após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento isolado. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** células leveduriformes após coloração de Gram (1000x).

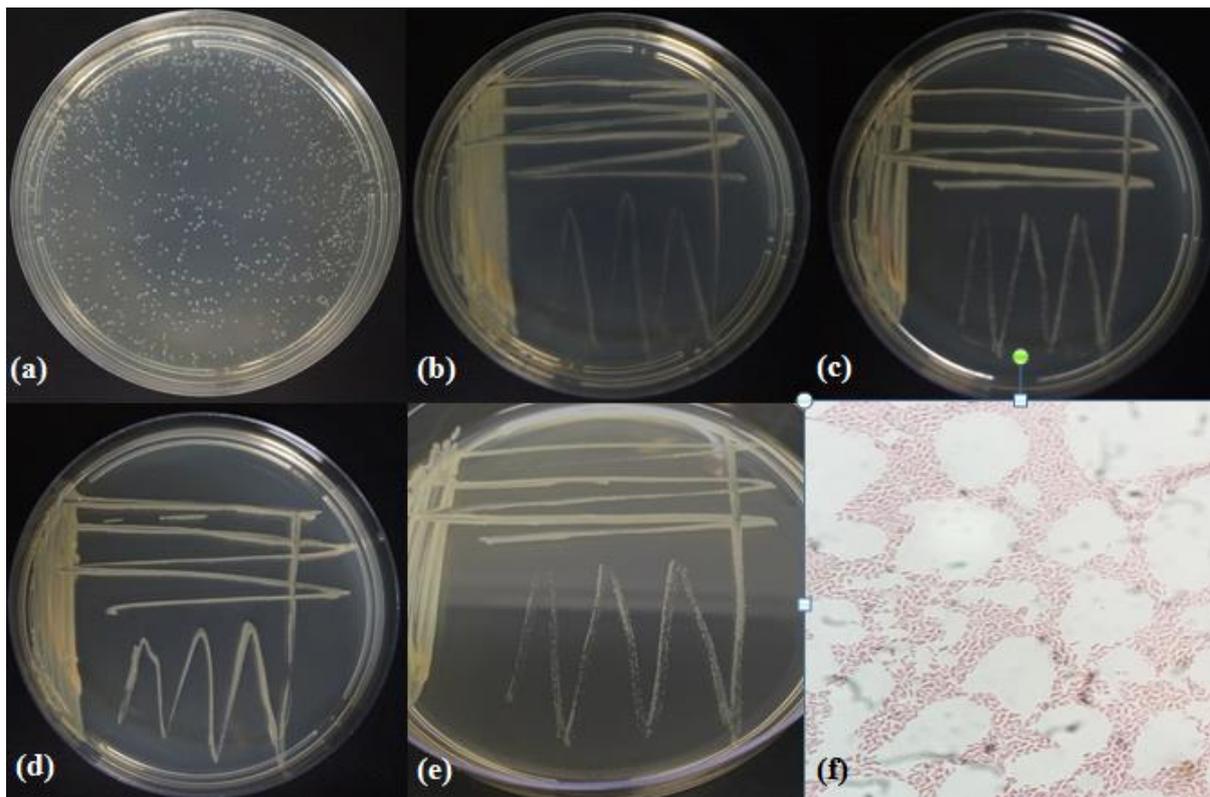
5.2.3 Bactérias

B. aryabhatai e *S. leidyi* não demonstraram nenhuma alteração morfológica pós-ensaio, tendo todas as características inicialmente observadas mantidas. *S. leidyi* comumente possui crescimento mais lento de que *B. aryabhatai* e suas colônias são exíguas, diferentemente do *Bacillus*. As Figuras 19 e 20 ilustram as características morfológicas macroscópicas após cada ensaio e microscopia característica observada de forma geral em todos os ensaios realizados.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 19. Características morfológicas de *B. aryabhatai* após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento isolado. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** bastonetes Gram positivos – cor roxa revelada na coloração de Gram (aumento de 1000x).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 20. Características morfológicas de *S. leidyi* após os ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento isolado. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** bastonetes Gram negativos – cor vermelha revelada na coloração de Gram (aumento de 1000x).

5.3 Validação dos ensaios testados

Após selecionar os ensaios 3, 4 e 8 como as condições mais otimizadas do delineamento experimental os mesmos passaram pelo teste validativo. Os ensaios foram repetidos por três vezes em momentos diferentes e nas três repetições comprovaram sua eficácia, conforme indica as Tabelas 9 para fungos filamentosos, 10 para leveduras e 11 para bactérias.

Os resultados abaixo comprovam que os testes são passíveis de repetitividade, uma vez que apresentaram a concentração inicial semelhante (também devido a padronização do número de placas utilizadas no preparo das amostras) e a concentração final permaneceu o esperado como satisfatório para os ensaios.

Durante os testes de validação também foi observado quanto às características morfológicas macroscópicas e microscópicas, não havendo nenhuma alteração relevante conforme já relatado nos resultados supracitados.

Tabela 9. Resultados dos testes de validação dos ensaios otimizados para fungos filamentosos.

Contagem (UFC/mL)				
<i>T. longibrachiatum</i>			<i>C.globosum</i>	
Ensaio	Pré-liofilização	Pós-liofilização	Pré-liofilização	Pós-liofilização
3	$3,9 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	$5,9 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
3	$4,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$6,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
3	$4,3 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	$5,7 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$
4	$5,6 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$6,5 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$
4	$5,3 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$6,2 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$
4	$5,4 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$6,3 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$
8	$4,9 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$5,9 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$
8	$3,4 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$6,8 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$
8	$3,93 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$6,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$

Tabela 10. Resultados dos testes de validação dos ensaios otimizados para leveduras.

Contagem (UFC/mL)				
<i>S. cerevisiae</i>			<i>R. mucilaginosa</i>	
Ensaio	Pré-liofilização	Pós-liofilização	Pré-liofilização	Pós-liofilização
3	$1,59 \times 10^{15}$	$2,9 \times 10^{14}$	$5,8 \times 10^{14}$	$3,0 \times 10^{14}$
3	$1,63 \times 10^{15}$	$3,1 \times 10^{14}$	$5,1 \times 10^{14}$	$2,9 \times 10^{14}$
3	$1,50 \times 10^{15}$	$3,2 \times 10^{14}$	$5,4 \times 10^{14}$	$3,1 \times 10^{14}$
4	$1,75 \times 10^{15}$	$1,17 \times 10^{15}$	$6,9 \times 10^{14}$	$5,4 \times 10^{14}$
4	$1,69 \times 10^{15}$	$1,12 \times 10^{15}$	$6,5 \times 10^{14}$	$5,8 \times 10^{14}$
4	$1,73 \times 10^{15}$	$1,14 \times 10^{15}$	$6,6 \times 10^{14}$	$5,0 \times 10^{14}$
8	$1,10 \times 10^{15}$	$1,01 \times 10^{15}$	$6,1 \times 10^{14}$	$5,7 \times 10^{14}$
8	$1,08 \times 10^{15}$	$1,01 \times 10^{15}$	$6,7 \times 10^{14}$	$6,1 \times 10^{14}$
8	$1,15 \times 10^{15}$	$1,10 \times 10^{15}$	$6,8 \times 10^{14}$	$6,2 \times 10^{14}$

Tabela 11. Resultados dos testes de validação dos ensaios otimizados para bactérias.

Contagem (UFC/mL)				
<i>B. aryabhatai</i>			<i>S. leidyi</i>	
Ensaio	Pré-liofilização	Pós- liofilização	Pré-liofilização	Pós-liofilização
3	1,6x10 ¹⁵	1,5x10 ¹⁵	1,88x10 ¹⁵	1,85x10 ¹⁵
3	1,8x10 ¹⁵	1,6x10 ¹⁵	1,85x10 ¹⁵	1,82x10 ¹⁵
3	1,4x10 ¹⁵	1,2x10 ¹⁵	1,79x10 ¹⁵	1,77x10 ¹⁵
4	2,1x10 ¹⁵	1,9x10 ¹⁵	1,77x10 ¹⁵	1,74x10 ¹⁵
4	1,8x10 ¹⁵	1,7x10 ¹⁵	1,81x10 ¹⁵	1,77x10 ¹⁵
4	2,0x10 ¹⁵	1,9 x10 ¹⁵	1,89x10 ¹⁵	1,86x10 ¹⁵
8	2,0x10 ¹⁵	1,8x10 ¹⁵	1,83x10 ¹⁵	1,80x10 ¹⁵
8	1,6x10 ¹⁵	1,5x10 ¹⁵	1,77x10 ¹⁵	1,74x10 ¹⁵
8	2,2x10 ¹⁵	2,1x10 ¹⁵	1,71x10 ¹⁵	1,68x10 ¹⁵

5.4 Reativação dos preservados após seis meses

5.4.1 Fungos filamentosos

A contagem da reativação dos preservados de fungos filamentosos após 180 dias, apresentados na Tabela 12, confirmam que não houve perda posterior à reativação logo após a preservação e que os micro-organismos permaneceram viáveis durante este período de estocagem. Este dado é fundamental para conferir segurança aos protocolos testados, uma vez que esses ensaios experimentais nunca foram avaliados após estocagem e estão prestes a serem incorporados na coleção.

Tabela 12. Contagem dos fungos filamentosos após 180 dias de preservação.

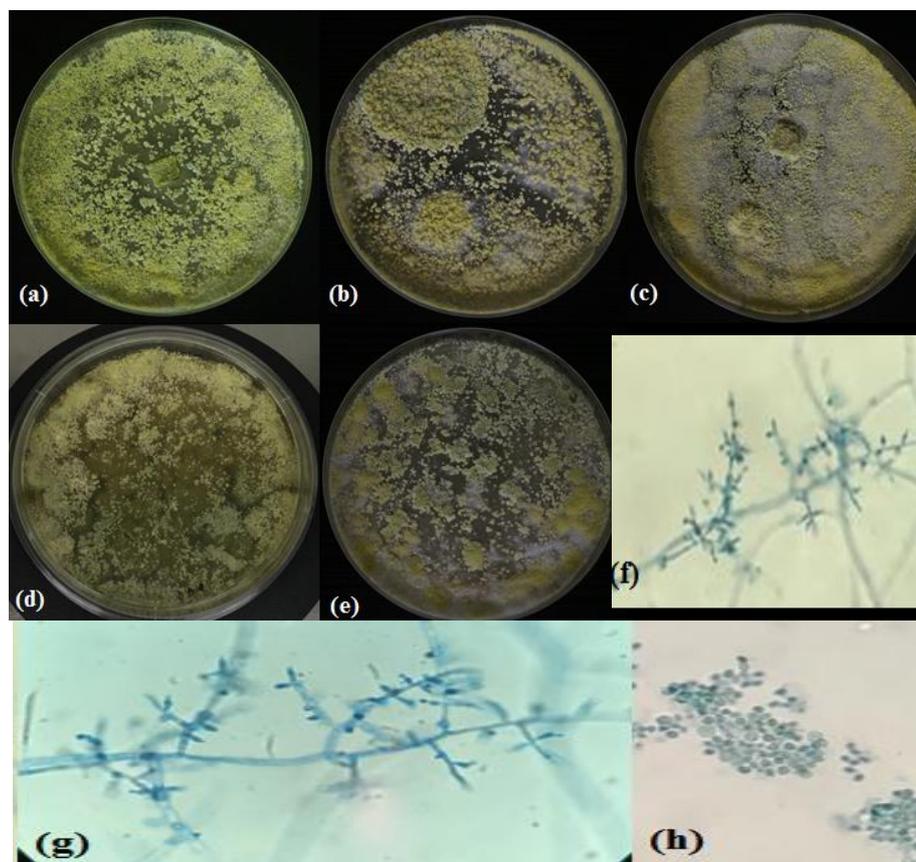
Contagem (UFC/mL) ¹				
<i>T. longibrachiatum</i>			<i>C.globosum</i>	
Ensaio	Pós liof	Pós 6m	Pós liof	Pós 6m
3	7x10 ⁷	2x10 ⁷	3,2x10 ⁴	1,7x10 ⁴
4	5,0x10 ⁸	3,1x10 ⁸	6,0x10 ⁴	2,5x10 ⁴
8	2,8x10 ⁸	1,7x10 ⁸	3,7 x10 ⁴	2,5x10 ⁴
Padrão	1,7x10 ⁸	1,0x10 ⁸	3,8 x10 ⁴	1,9x10 ⁴

¹ Média de triplicatas

Conforme anteriormente citado, a liofilização é um método de preservação capaz de perdurar por mais de 40 anos, porém, diversas literaturas, inclusive protocolos online

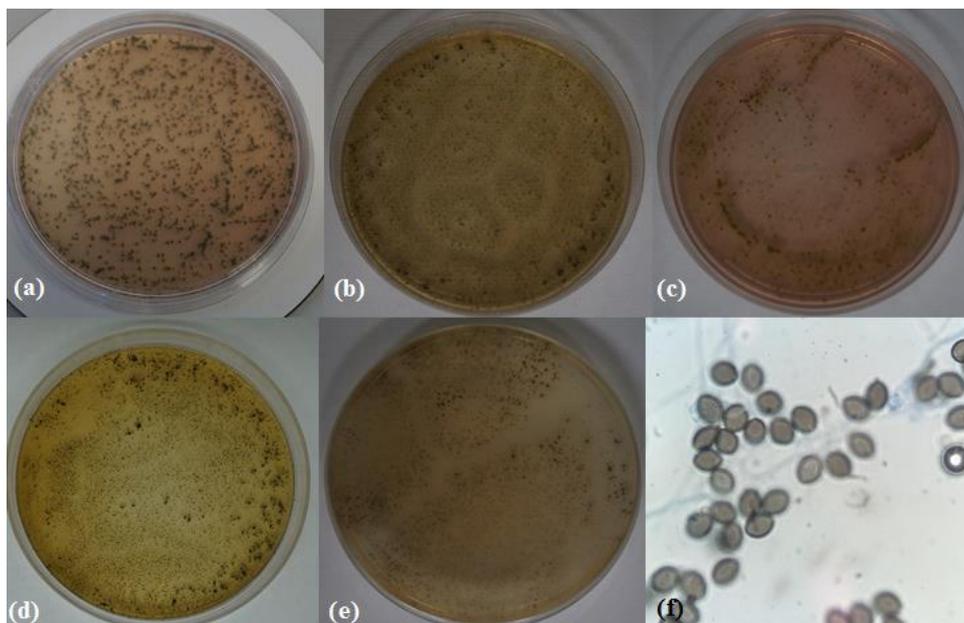
disponíveis pela CBS – KNAW *Collections* indicam que a reativação do liofilizado ocorra em dois momentos: logo após a preservação e após armazenamento a fim de rastrear a viabilidade do micro-organismo e assim evitar possíveis perdas totais da linhagem. Smith e Onions (1994) analisaram diferentes linhagens pertencentes a diversos filós do grupo dos fungos filamentosos após a liofilização. Eles reativaram as linhagens após um período entre 7 e 20 anos e observaram que exemplares das ordens Hypocreales e Sordariales – ordens onde estão os fungos filamentosos deste estudo, apresentaram taxa de viabilidade de 93 e 97%, respectivamente. De modo geral, o filo Ascomycota foi o que apresentou maiores taxas de viabilidade após longo período. Micro-organismos dos filós Basidiomycota e Oomycota tiveram suas viabilidades prejudicadas. Estes dados reforçam o fato de que fungos filamentosos esporulados têm maiores chances de sobrevivida após a liofilização.

As Figuras 21 e 22 reportam as características macroscópicas das linhagens *T. longibrachiatum* e *C. globosum* (respectivamente) após este período, indicando que também não houve alterações.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 21. Características morfológicas de *T. longibrachiatum* após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f e g** estruturas reprodutivas (conídios e fiálides) - (aumento de 1000x). **h** conídios esféricos colorido com Azul de Lactofenol (aumento de 400x).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 22. Características morfológicas de *C.globosum* após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** ascósporos limoniformes (aumento de 400x).

5.4.2 Leveduras

A levedura *S. cerevisiae* apresentou na reativação do ensaio 3 uma queda de 2 ciclos logarítmicos e no ensaio 4 apenas de 1; os demais ensaios não houveram perdas em relação á ultima contagem. A *R. mucilaginosa* teve uma sensível queda apenas no ensaio 3. Esses dados estão destacados na Tabela 13.

Os estudos feitos por Costa e Ferreira (1991) e Silva et al (1992) revelam que mesmo a liofilização promovendo taxas significativas de morte para o grupo das leveduras, a viabilidade celular remanescente é estável durante o período de estocagem, aspecto observado para os ensaios 4, 8 e padrão.

Tabela 13. Contagem das leveduras após 180 dias de preservação.

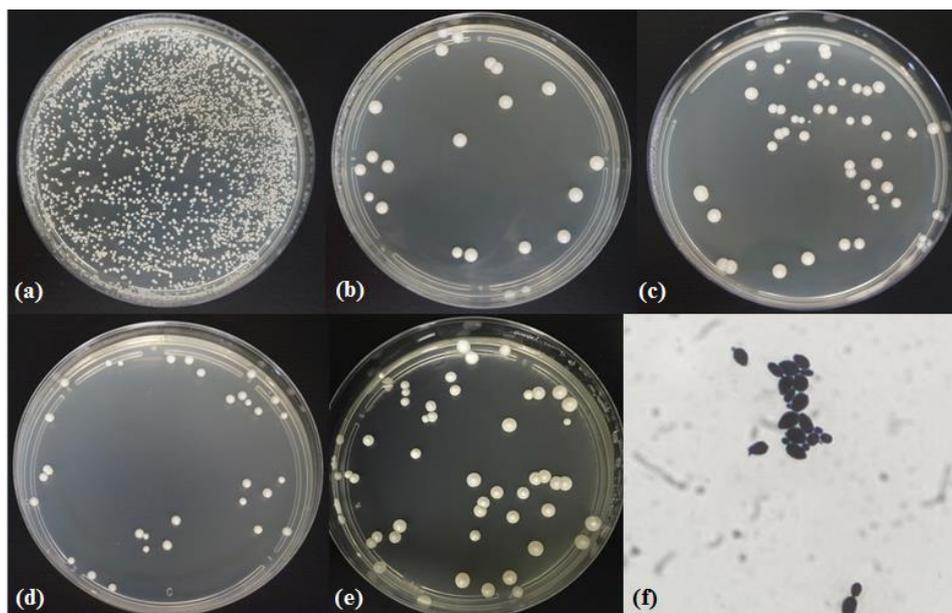
Ensaio	Contagem (UFC/mL) ¹			
	<i>S.cerevisiae</i>		<i>R. mucilaginosa</i>	
	Pós liof	Pós 6m	Pós liof	Pós 6m
3	1,8x10 ¹⁴	2,1x10 ¹²	3,6x10 ¹⁴	6x10 ¹³
4	1,07x10 ¹⁵	2,5x10 ¹⁴	4,8x10 ¹⁴	3,4x10 ¹⁴
8	5,7x10 ¹⁴	1,3x10 ¹⁴	1,51 x10 ¹⁵	1,06x10 ¹⁵
Padrão	6,9x10 ¹⁴	3,3x10 ¹⁴	1,4 x10 ¹⁴	1,0x10 ¹⁴

¹ Média de triplicatas

Santos (2013) avaliou em seu estudo a recuperação de leveduras recém liofilizadas e após 180 dias notando que houve perdas tanto durante o processo quanto durante a estocagem, fato semelhante ocorreu neste presente estudo no ensaio 3 para *S. cerevisiae*; notou-se perda na contagem logo após a liofilização e também na reativação após seis meses, tendo a linhagem perdido 3 ciclos logarítmicos desde sua contagem inicial neste protocolo

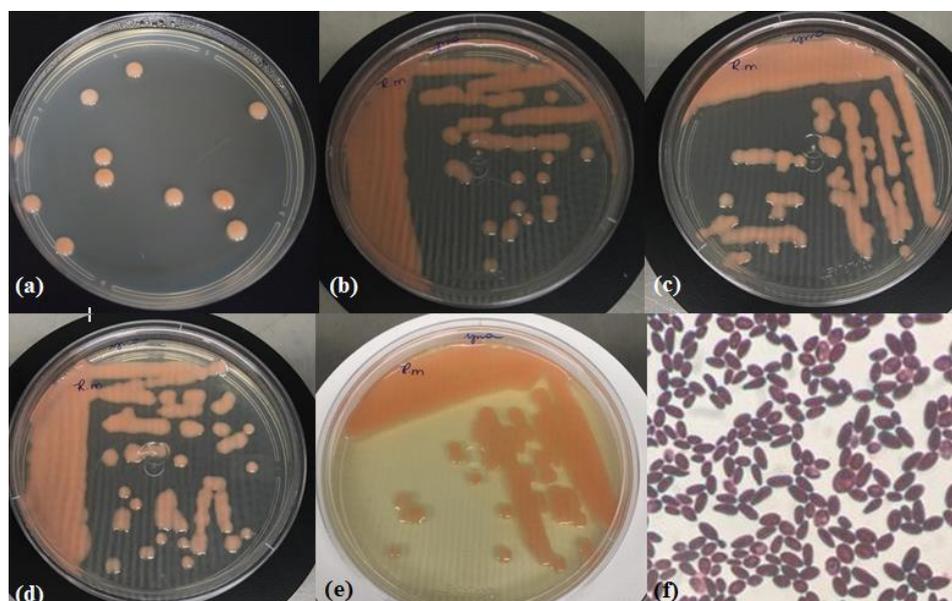
Outro estudo de Miyamoto-Shinohara et al. (2006) investigou a taxa de sobrevivência de diferentes micro-organismos liofilizados submetidos a estocagem por mais de 20 anos e *S. cerevisiae* obteve mais perdas logo após a liofilização do que subsequente a estocagem. O autor associa este fato a condições favoráveis e adequadas de armazenamento uma vez que já conhecida à perda logo após o processo de preservação.

As figuras 23 e 24 indicam as características macroscópicas das linhagens deste grupo após serem reativadas depois de 6 meses de preservação. Percebe-se que as características morfológicas também não sofreram alterações.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 23. Características morfológicas de *S. cerevisiae* após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento isolado. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** células leveduriformes coradas após coloração de Gram (aumento de 1000x).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 24. Características morfológicas de *R. mucilaginosa* após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento isolado. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** células leveduriformes coradas após coloração de Gram (aumento de 1000x).

5.4.3 Bactérias

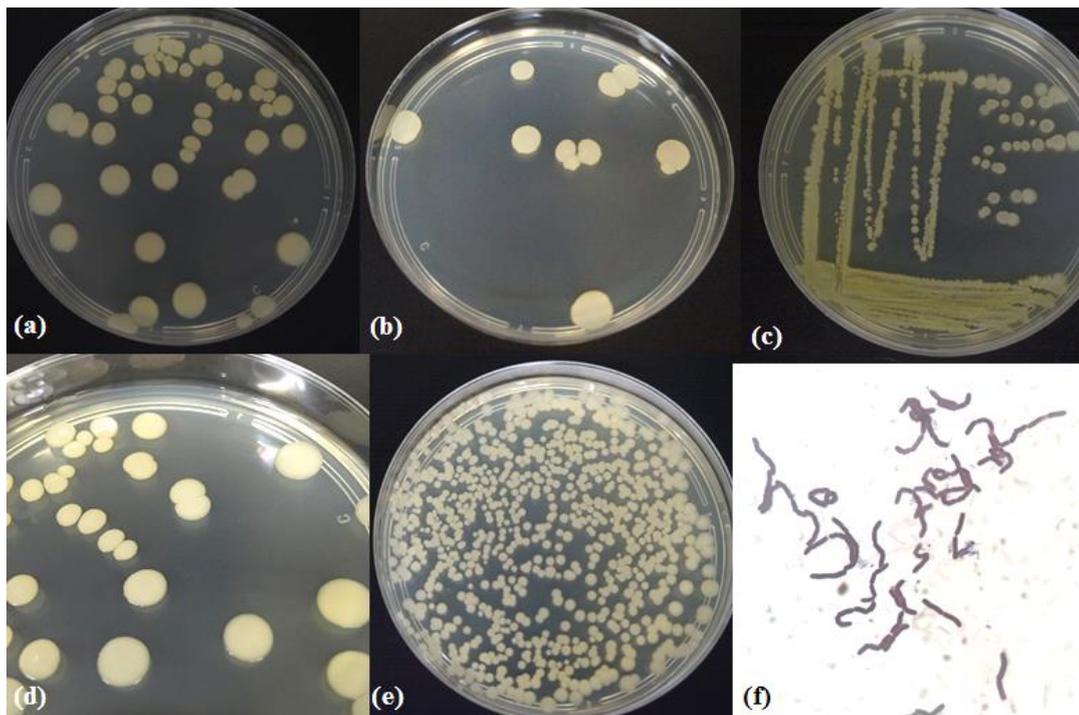
O grupo das bactérias obteve muito sucesso na reativação pós estocagem, pois apenas o ensaio 3 indicou uma ínfima perda para *B. aryabhatai*, conforme aponta a Tabela 14. Sola (2012) observou que a taxa de sobrevivência de algumas espécies bacterianas se mantinham fixas com o passar do tempo, porém outras declinavam o que não foi observado neste estudo, pois todas se mantiveram até mesmo na checagem logo após a preservação. Também não houve diferença quanto à bactéria ser Gram positiva ou negativa, tendo as linhagens apresentado bons resultados em quase todos os protocolos testados.

Tabela 14. Contagem das bactérias após 180 dias de preservação.

Ensaio	Contagem (UFC/mL) ¹			
	<i>B. aryabhatai</i>		<i>S.leidyi</i>	
	Pós liof	Pós 6m	Pós liof	Pós 6m
3	1,5x10 ¹⁵	6x10 ¹⁴	1,80x10 ¹⁵	1,21x10 ¹⁵
4	1,8x10 ¹⁵	1,2x10 ¹⁵	1,81x10 ¹⁵	1,34x10 ¹⁵
8	3,0x10 ¹⁵	1,1x10 ¹⁵	1,81 x10 ¹⁵	1,39x10 ¹⁵
Padrão	1,1x10 ¹⁵	1,0x10 ¹⁵	1,28 x10 ¹⁵	1,15x10 ¹⁵

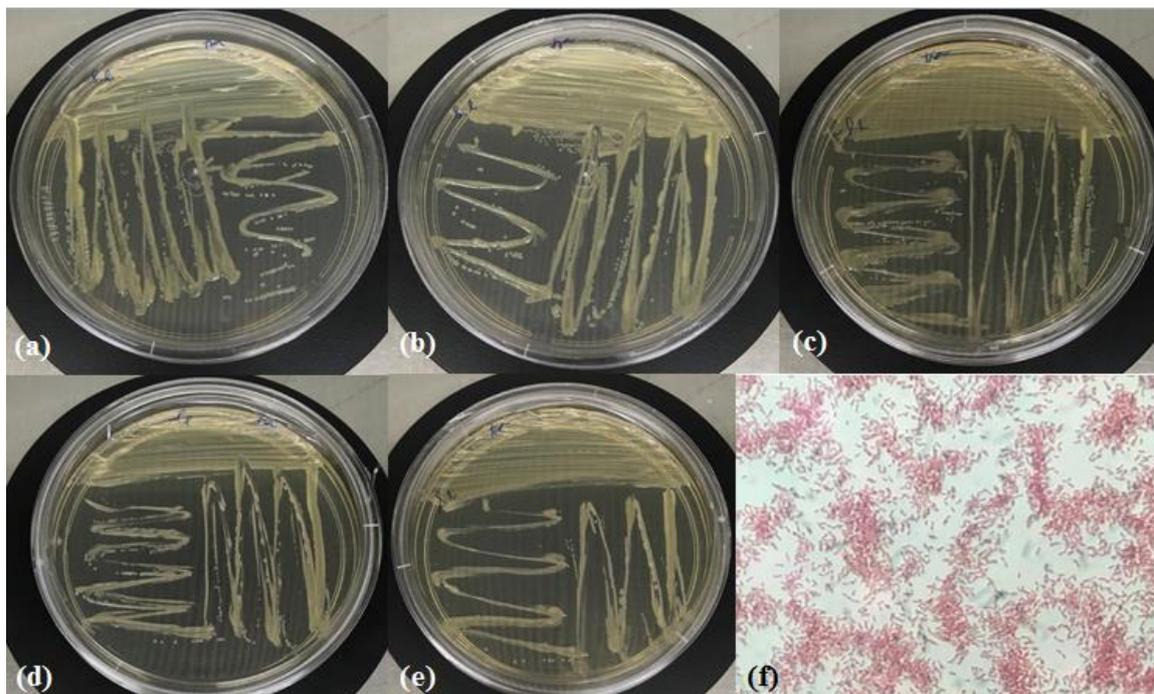
¹ Média de triplicatas

As Figuras 25 e 26 ilustram as características macroscópicas e microscópicas de ambas as linhagens e confirma que não houve alterações em relação à morfologia das células.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 25. Características morfológicas de *B. aryabhatai* após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento isolado. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** bastonetes Gram positivos – cor roxa revelada pela coloração de Gram (aumento de 1000x).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 26. Características morfológicas de *S. leidy* após seis meses dos ensaios otimizados e características microscópicas observadas. **a** Crescimento isolado. **b** pós-ensaio padrão. **c** pós-ensaio 3. **d** pós-ensaio 4. **e** pós-ensaio 8. **f** bastonetes Gram negativos – cor vermelha revelada na coloração de Gram (aumento de 1000x).

5.5 Análise estatística

As análises de efeito indicam a significância dos parâmetros testados nos ensaios validados em relação às perdas de viabilidade dos micro-organismos. Conforme apontam as Tabelas 15 e 16, os campos destacados na cor verde possuem índice de confiança de 95% (pois o p-valor encontra-se menor que 0,05) e os campos destacados na cor amarela possuem índice de confiança de 90% (pois o p-valor encontra-se menor que 0,1). Em ambos os casos os valores são considerados estatisticamente significativos, ou seja, aquele parâmetro correspondente teve influência para evitar a perda de viabilidade do micro-organismo. Os campos em branco não apresentam significância estatisticamente.

Tabela 15. Análise de efeitos dos fatores do delineamento sob a perda de viabilidade dos micro-organismos – fungos filamentosos e leveduras¹.

Fator	<i>T. longibrachiatum</i>	<i>C. globosum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
	p-valor	p-valor	p-valor	p-valor
Quantidade de inóculo	0,0133	0,9271	0,0604	0,2923
T°C de congelamento	0,0720	0,2771	0,1206	0,5093
Tempo de congelamento	0,3031	0,8032	0,4323	0,8716
Tempo de secagem	0,1683	0,6016	0,8885	0,6790

¹ Lê-se: P < 0,05 = 95% confiança / P < 0,1 = 90% de confiança.

Tabela 16 Análise de efeitos dos fatores do delineamento sob a perda dos micro-organismos – bactérias¹.

Fator	<i>B. aryabhatai</i>	<i>S. leidyi</i>
	p-valor	p-valor
Quantidade de inóculo	0,0064	0,2558
T°C de congelamento	0,0179	0,1038
Tempo de congelamento	0,7173	0,7359
Tempo de secagem	0,1021	0,0428

¹ Lê-se: P < 0,05 = 95% confiança / P < 0,1 = 90% de confiança.

O fator “quantidade de inóculo no frasco” mostrou ter sido significativo para *T. longibrachiatum*, *S. cerevisiae* e *B. aryabhatai* e o fator “temperatura de congelamento” apenas para *T. longibrachiatum* e *B. aryabhatai*. O “tempo de secagem” foi significativo apenas para *S. leidyi*, mas, ainda assim não há suporte nos resultados que possam indicar que a linhagem tenha de fato sofrido menor perda em protocolos com tempo de secagem menor, uma vez que o protocolo padrão tem quase 30 horas de secagem e a bactéria também se mostrou viável nos testes.

O teste de Tukey foi realizado com todos os ensaios validados, incluindo o padrão, e mostrou que as médias diferem estatisticamente no caso dos fungos filamentosos e leveduras (Tabela 17). No caso da bactéria *B. aryabhatai* as médias não diferiram nos

ensaios Padrão, 3 e 4 e nos ensaios 3, 4 e 8, apontando diferença estatística apenas entre o ensaio padrão e o ensaio 8; para *S. leidy* o ensaio 3, 4 e 8 pertencem ao mesmo agrupamento indicando que as médias são estatisticamente iguais, sendo apenas o protocolo padrão estatisticamente diferente. O índice de confiança deste teste é de 95%.

Tabela 17. Agrupamentos do teste de Tukey.

Linhagens	Ensaio	Média	Desvio padrão	Agrupamento¹
<i>T. longibrachiatum</i>	Padrão	28,8	4,2	A
	Ensaio 3	97,9	0,2	B
	Ensaio 4	4,3	0,9	C
	Ensaio 8	18,2	2,1	D
<i>C. globosum</i>	Padrão	29,0	5,9	A
	Ensaio 3	80,5	1,6	B
	Ensaio 4	2,6	0,9	C
	Ensaio 8	38,7	1,2	D
<i>S. cerevisiae</i>	Padrão	20,9	5,8	A
	Ensaio 3	80,5	1,6	B
	Ensaio 4	33,7	0,5	C
	Ensaio 8	6,3	1,9	D
<i>R. mucilaginoso</i>	Padrão	33,8	4,0	A
	Ensaio 3	44,7	3,1	B
	Ensaio 4	24,1	2,2	C
	Ensaio 8	8,1	1,3	D
<i>B. aryabhatai</i>	Padrão	19,5	8,0	A
	Ensaio 3	10,6	4,0	A B
	Ensaio 4	6,7	2,5	A B
	Ensaio 8	6,9	2,8	B
<i>S. leidy</i>	Padrão	12,8	3,8	A
	Ensaio 3	1,4	0,3	B
	Ensaio 4	1,8	0,3	B
	Ensaio 8	1,5	0,4	B

¹ Letras diferentes representam que os dados diferem entre si estatisticamente; letras iguais na mesma coluna indicam que os dados não diferem entre si.

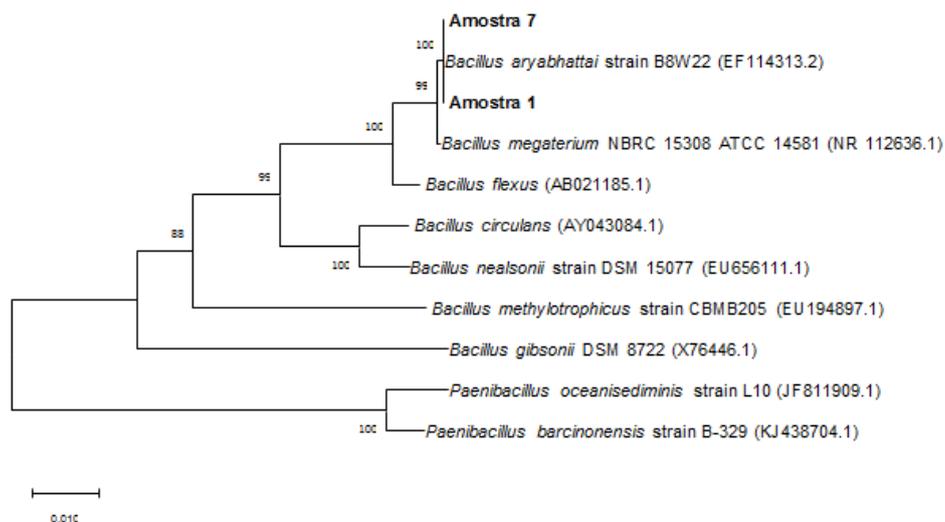
É importante destacar que embora os valores de desvio padrão estejam elevados em alguns casos – o ideal é que ele esteja o mais próximo de 0, as diferenças de perdas entre os ensaios validados e o padrão são relativamente pequenas, conforme já ilustrado pela figura 14.

5.6 Autenticação molecular

As análises moleculares realizadas permitiram autenticar as linhagens trabalhadas durante este estudo. Apesar das linhagens terem sido avaliadas quanto às características macroscópicas antes de todos os ensaios, esta etapa dentro da CBMAI visa corroborar com essas observações e oferecer um isolado com autenticação de confiabilidade assegurada.

Foram analisadas amostras do ensaio padrão e do ensaio 4, pelo fato dele ter sido a condição melhor otimizada do delineamento, apenas com a finalidade de mostrar que as linhagens testadas são as mesmas.

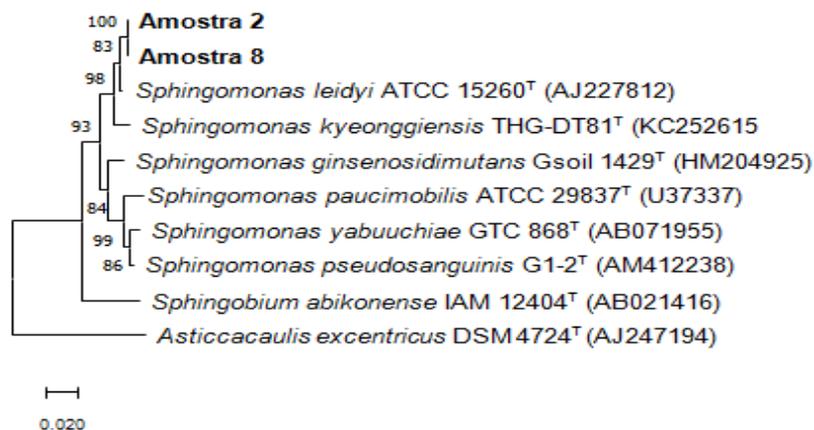
De acordo com a análise de distância filogenética realizada pelo método de x ilustrada pela figura 27 é possível observar que a amostra de *B. aryabhatai* (representada por “Amostra 1) testada no protocolo Padrão é a mesma amostra que foi testada no protocolo mais otimizado (representada por “Amostra 7”).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 27. Análise de distância filogenética da linhagem *B. aryabhatai*.

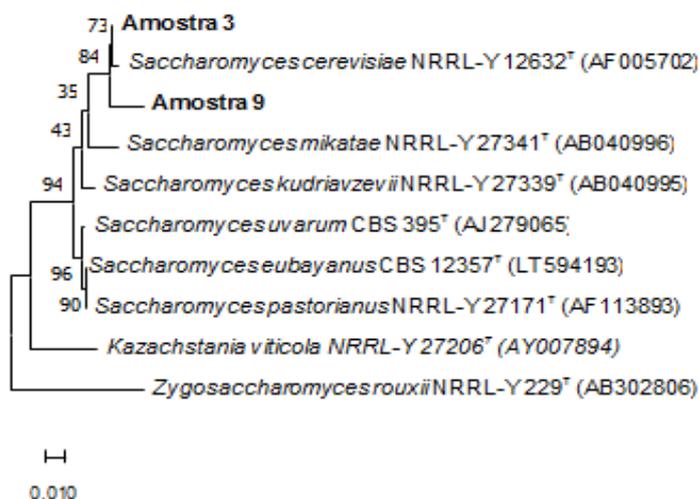
De acordo com a análise de distância filogenética ilustrada pela figura 28 é possível observar que a amostra de *S. leidy* (representada por “Amostra 2) testada no protocolo Padrão é a mesma amostra que foi testada no protocolo mais otimizado (representada por “Amostra 8”).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 28. Análise de distância filogenética da linhagem *S. leidyi*.

De acordo com a análise de distância filogenética ilustrada pela figura 29 é possível observar que a amostra de *S. cerevisiae* (representada por “Amostra 3”) testada no protocolo Padrão é a mesma amostra que foi testada no protocolo mais otimizado (representada por “Amostra 9”).

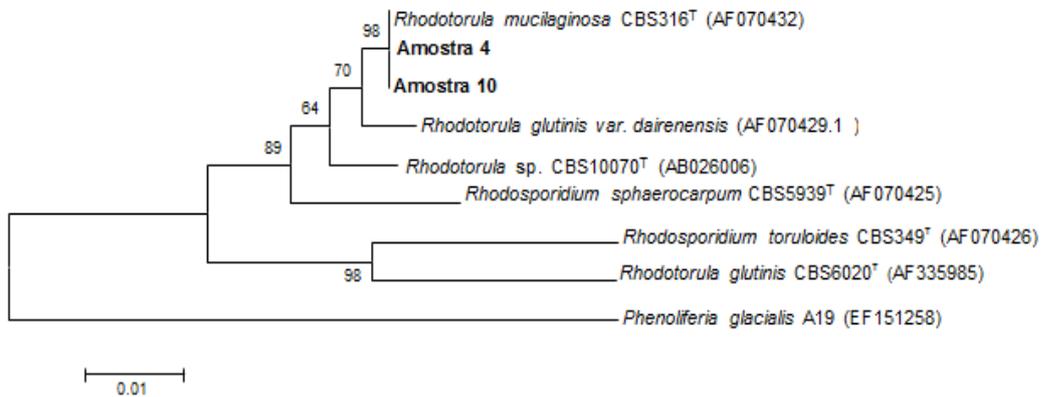


Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 29. Análise de distância filogenética da linhagem *S. cerevisiae*

De acordo com a análise de distância filogenética ilustrada pela Figura 30 é possível observar que a amostra de *R. mucilaginosa* (representada por “Amostra 4”) é

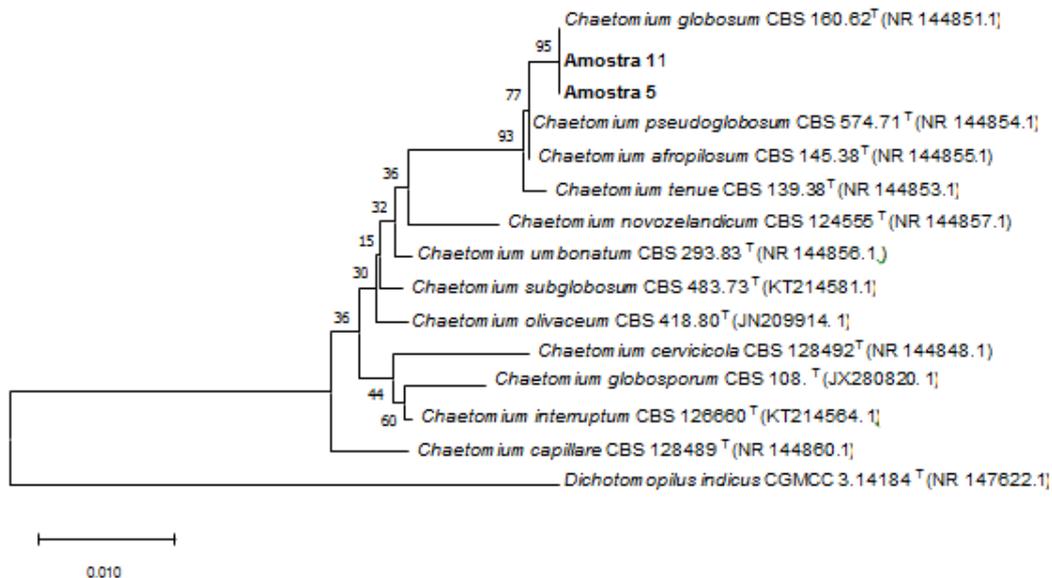
testada no protocolo Padrão é a mesma amostra que foi testada no protocolo mais otimizado (representada por “Amostra 10”).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 30. Análise de distância filogenética da linhagem *R. mucilaginosa*

De acordo com a análise de distância filogenética ilustrada pela figura 31, é possível observar que a amostra de *C. globosum* (Representada por “Amostra 5”) testada no protocolo Padrão é a mesma amostra que foi testada no protocolo mais otimizado (representada por “Amostra 11”)



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Figura 31. Análise de distância filogenética da linhagem *C. globosum*.

De acordo com a análise de distância filogenética ilustrada pela figura 32, é possível observar que a amostra de *T. longibrachiatum* (Representada por “Amostra 6”) testada no protocolo Padrão é a mesma amostra que foi testada no protocolo mais otimizado (representada por “Amostra 12”)

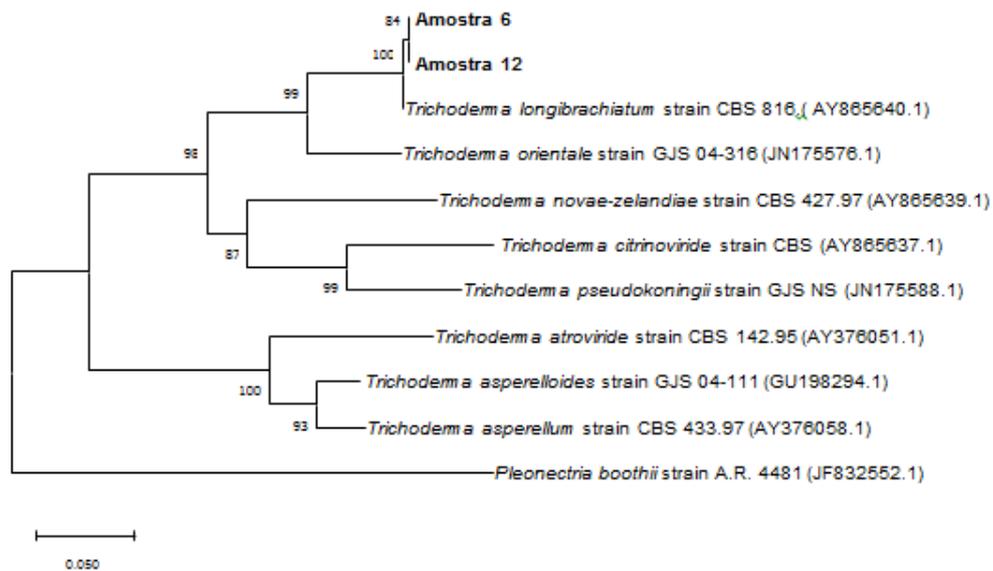


Figura 32. Análise de distância filogenética da linhagem *T. longibrachiatum*.

6. CONCLUSÃO

- O delineamento experimental é adequado para otimizações de variáveis envolvidas no processo de liofilização.
- A diminuição do tempo de secagem primária e a exclusão da etapa de secagem secundária permitem a redução do tempo total de liofilização em mais de 50%, sem prejuízo da qualidade do produto final, quando comparado com aquele obtido no protocolo padrão.
- Os ensaios de número 3,4 e 8 são adequados para todas as linhagens estudadas, garantindo viabilidade satisfatória e manutenção das características morfológicas. Dentre esses destaca-se o protocolo 4.
- A liofilização é recomendada para o grupo das leveduras embora elas possuam células maiores.
- As otimizações propostas são uma importante contribuição para coleções de culturas microbianas e laboratórios que utilizem equipamentos semelhantes ao aqui investigado.

REFERÊNCIAS

AAMIR, S. et al. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. **Plant Pathology & Quarantine**, Pune, v. 2, n. 5, p.74-81, 20 out. 2015. Disponível em: <https://www.plantpathologyquarantine.org/pdf/PPQ_5_2_6.pdf>

ABADIAS, M. et al. Viability, Efficacy, and Storage Stability of Freeze-Dried Biocontrol Agent *Candida sake* Using Different Protective and Rehydration Media. **Journal Of Food Protection**, [s.l.], v. 64, n. 6, p.856-861, jun. 2001. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-64.6.856>.

ABREU, M. M.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, [s.l.], v.1, n.1, p.1-16, 1 abr. 2004. Centro de Ensino Unificado de Brasília. <<http://dx.doi.org/10.5102/ucs.v2i2.535>>

ALCARDE, A. R. **Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas pelo processo de liofilização**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 1996.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI B. N.; DESHMUKH S. K. **Fungi: multifaceted microbes**. New Delhi: CRC Press, 2007, p. 171-178.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 299 p.

BARY, A. **Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 316 p, 1866.

BETTIOL, Wagner et al. **Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa, 2012. 156 p.

BRASIL. Decreto n. 8.772, de 11 de mai. de 2016. **Uso sustentável da biodiversidade**, Brasília, DF, 11 mai. 2016.

BRASIL. Lei n. 8.666, de 21 de jun. de 1993. **Licitações e contratos da Administração pública e de outras providências**, Brasília, DF, 21 jun. 1993.

BRASIL. Lei n. 13.123, de 20 de mai. de 2015. **Patrimônio Genético no Brasil**, Brasília, DF, 20 mai. 2015.

BRASIL. Portaria n. 130, de 18 de fev. de 2016 **Altera a Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos**, Brasília, DF, 18 fev. 2016.

BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados**. 2005. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/im317.htm>> Acesso em: 07 dez. 2019.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. **Coleções de culturas de microrganismos**. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, 2004.

CHRIST. Smart freeze drying: basic principles, optimum procedures and applications. 2010. Disponível em: <http://www.martinchrist.de/fileadmin/user_upload/christ/04_anwendungen/>. Acesso em: 02 dez. 2019.

CNI - Confederação Nacional da Indústria. **Biotechnologia do Brasil deve movimentar 300 bilhões de euros em 2030**. 2015. Disponível em: <<https://www.investe.sp.gov.br/noticia/biotechnologia-do-brasil-deve-movimentar-300-bilhoes-de-euros-em-2030/>>. Acesso em: 02 dez. 2019.

CROUS, P.W.; VERKLEIJ, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; HOUBRAKEN, J. Westerdijk Laboratory Manual Series No. 1. Fungal Biodiversity. Webmaster Laboratory Manual Series, 425pg, 2019.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C. **Conservação de amostras de vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós- graduação em Ciências Veterinária – Universidade Estadual do Ceara. UECE, Ceará, 2010.

DELLARETTI, E. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. 2014. 36 p. Monografia (Bacharelado em Biosistemas) – Universidade Federal São João Del-Rei. Sete Lagoas, 2014.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: The economic power of microbe. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.

EBLSA. Aplicação de produtos liofilizados na indústria. Disponível em: <<http://www.eblsa.com.br/>>

EMBRAPA. **Biotecnologia Industrial é ferramenta para chegar à bioeconomia**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/25638625/biotecnologia-industrial-e-ferramenta-para-chegar-a-bioeconomia>>. Acesso em: 06 dez. 2019.

GARCIA, L. P. **Liofilização aplicada a alimentos**. 2009. 45 p. Trabalho Acadêmico (Graduação Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2009.

GOULART, M. **Análise da diversidade e prospecção do potencial biotecnológico de bactérias endofíticas associadas às plantas de maracujá (*Passiflora incarnata*)**. 2019. 192 f. Tese (Doutorado) – Curso de Doutorado em Genética e Biologia Molecular na área de Genética de Micro-organismo, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2019.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 43, p. 895-914, 1997.

HUNTER-CEVERA, J. C.; BELT, A. **Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry**. London: Academic Press, 263 p, 2003.

KHAN, A. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 8, p.689-695, 4 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <<http://dx.doi.org/10.1007/s12275-014-4002-7>>

KING, V. A. E.; SU, J. T. Dehydration of *Lactobacillus acidophilus*. **Process Biochemistry Journal**, [s.l.], v. 28, p. 47–52, 1993.

KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. **Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures - A Manual of Laboratory Methods**. 2nd ed., London: Academic Press. 308 p, 1991.

KIRSOP, B. E.; SNELL, J. J. S. Maintenance of Microorganisms. **A manual of Laboratory Methods**. London: Academic Press. 207 p, 1984.

KRUGER, T.L.; BACCHI, L.M.A. (1995) - Fungos. In: Filho, A.B.; Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M., Camargo, L.E.A. - **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 46–95.

LANGE, L. et al. The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy. **Ima Fungus**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 87-92, jun. 2012.

MACHADO, D. et al. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 274-288, mar. 2012.

MALIK, A. New freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.259-271, set. 1988.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. **Controle Biológico**, Jaguariúna, v. 1, p. 18-67, set. 1998. EMBRAPA.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. et al. Survival of freeze-dried bacteria. **The Journal Of General And Applied Microbiology**, Tsukuba, v. 1, n. 54, p. 9-24, fev. 2008.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. et al. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. **Cryobiology Journal**, New York, v. 52, n. 1, p. 27-32, fev. 2006.

MORGAN, C. A. et al. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**. Amsterdam, v. 66, n. 2, p.183- 193, aug. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632005>>.

NEVES, C. F. C. et al. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**. v. 25, n 2, p. 327-329, 2002.

OKAFOR, N. The Preservation of the Gene Pool in Industrial Organisms: Culture Collections. In: OKAFOR, N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. CRC Press, 2007. Cap. 8. p. 171-178.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de alimentos**: Componentes dos alimentos e processos. Artmed, 2005. 294 p.

PALMFELDT, J.; RADSTROM, P.; HAHN-HAGERDAL, B. Optimization of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. **Cryobiology Journal**, [s.l.], v. 47, p. 21–29, 2003.

PAOLI, DE P. Bio-banking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 897-910, nov. 2005.

PATERSON, R.; LIMA, N. Bioprospecting: Success, potential and constraints. In: PATERSON, R.; LIMA, N. **Topics in Biodiversity and Conservation**. Springer, 2017, 303 p.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer, 1991. p. 179-197.

PICCININ, E.; PIERO, R.; PASCHOLATI, S. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, [s.l.] v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005.

PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y. Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 339, n. 1, p. 1-9, 22 nov. 2012. Oxford University Press (OUP). <<http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12034>>

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Cárita, 2009. 357 p.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, K.F.; PFENNING, L. Diversidade no reino Fungi: Ascomycota. 2007. Disponível em: <<https://www.biota.org.br/pdf/v1cap03.pdf>>

SANTOS, D. **Viabilidade de leveduras durante o processo de liofilização utilizando diferentes crioprotetores**. 2013. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Tecnólogo em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Ponta Grossa, 2013.

SANTOS, T.; SOUZA, B. Fungos endofíticos em plantas economicamente importantes: aspectos ecológicos, diversidade e potenciais aplicações biotecnológicas. **Journal Of Bioenergy And Food Science**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 113-126, 08 jul. 2017.

SILVA, F. L. et al. Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil. **Revista de Microbiologia**. p. 177- 182. 1992.

SILVA, M. **Fungos endofíticos associados à *Passiflora incarnata* e avaliação de seu potencial biotecnológico**. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP, Rio Claro, 2017.

SMITH, D.; ONIONS, A. **The preservation and maintenance of living fungi**. Wallingford: Cab International, 1994. 122 p.

SOLA, M. et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, [s.l.], v. 8, n. 14, p. 1-21, 2012.

SOUZA, C. **Isolamento de leveduras de madeira em decomposição para fermentação de pentoses**. 2015. 25 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Araras, 2015.

SOWMYA, H. V. et al. Low density polyethylene degrading fungi isolated from local dumpsite of Shivamogga district. **International Journal of Biological Research**, [s.l.], v. 2, n. 2 p. 39-43, 2014.

TUKEY, J. W. The problem of multiple comparisons. In: JONES, L. **The Collected Works of John W. Tukey**. CRC Press, 1953 p. 100-116

TERRONI, H. C et al. Liofilização. **Revista Científica Unilago**. Disponível em: <<http://www.terroni.com.br/>> 2011.

VERGNE, M.; TUTUNJI, V. Implantação e Manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**. v. 2, n. 2, p. 236- 251, 2008.

YESQUÉN, G. **Comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Passiflora incarnata* e seu potencial na promoção de crescimento vegetal.** 2018. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular na área de Genética de Micro-organismo, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2018.

ZHANG, G. et al. Antifungal Metabolites produced by *Chaetomium globosum* N°.04, an Endophytic Fungus Isolated from *Ginkgo biloba*. **Indian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 2, p. 175-80, 2013.

ANEXOS

Anexo I: Declaração de Bioética/ e ou Biossegurança.

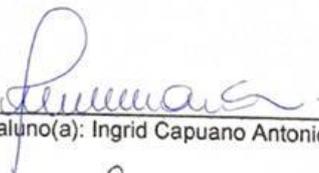


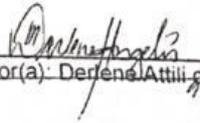
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone: (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Otimização do protocolo de liofilização para coleções de culturas microbianas*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Ingrid Capuano Antonio

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Derlene Attili de Angelis

Data: 18 de fevereiro de 2020

Anexo II: Declaração de direito autoral.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Otimização do protocolo de liofilização para coleções de culturas microbianas**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28 de Abril de 2020

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Ingrid Capuano Antonio**
RG n.º 49000884-7

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Dereene Attili de Angelis**
RG n.º 12.314.446