

PRINCÍPIOS BÁSICOS DA CRIOMICROBIOLOGIA: ENFOQUE NOS TIPOS DE MICRO-ORGANISMOS E NOS PRINCIPAIS AGENTES CRIOPROTETORES

[Basic principles of criomicrobiologia: focus in kind of microorganisms and principals cryoprotectants agents]

Tereza D'ávila de Freitas Aguiar^{1*}, Maria Fátima da Silva Teixeira¹, Carlos Henrique de Andrade Teles¹, Gabrielle Rosemblit Martins¹, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior¹, Edmara Chaves Costa²

1 Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Virologia, Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi, CEP 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil.

2 Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, LAMOFOPA.

RESUMO - O reconhecimento da grande relevância da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes microbiológicos. Contudo, ainda não existe uma fórmula singular, ideal ou universal que possibilite a eficiência da estocagem e preservação microbiana a longo prazo. Consequentemente, diversos micro-organismos para os quais há uma crescente demanda, ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, fazendo da criobiologia um campo de vasto potencial para o desenvolvimento de pesquisas. Nesse contexto, a proposta dessa revisão é discutir os princípios básicos da criomicrobiologia, com enfoque na preservação dos variados tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores, tomando como base estudos disponíveis na literatura científica.

Palavras-Chave: Criopreservação; Crioprotetor; Micro-organismos.

ABSTRACT - The recognizing the great importance of microbial biodiversity for human development has led to the improvement of techniques for the conservation of diverse microbiological specimens. However, there isn't a singular, ideal or universal method to provide the efficiency of the long-term microorganisms stock and preservation. Many microorganisms for which there is a growing demand still wait for the development of satisfactory methodologies to their conservation, making the cryobiology a field of vast potential for the development of researches. Then, the proposal of this review is to discuss the basic principles of cryomicrobiology, focusing the preservation of kinds microorganisms and principals agents cryoprotectants, using the available studies in the contemporary scientific literature as base.

Keywords: Cryopreservation; Cryoprotective agent; Microorganisms.

INTRODUÇÃO

Estudos sobre a patogênese microbiana, etiologia e epidemiologia de doenças infecciosas e microbiologia ambiental são, em sua maioria, baseados na obtenção de amostras biológicas e, em muitos casos, na sua posterior preservação (Paoli, 2005).

Nesse contexto, o reconhecimento da grande relevância da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano e animal tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes microbiológicos. E

devido à emergente importância atribuída à estocagem de amostras, muitas instituições têm investido na constituição de estoques (biobancos), implementando inúmeras técnicas de preservação, como a criopreservação e a liofilização, com a adoção de protocolos próprios e avançadas tecnologias no controle de dados (Figueiredo, 2001; Holland et al., 2003; Paoli, 2005).

O armazenamento de amostras das mais variadas origens apresenta propósitos diagnósticos e de pesquisa, abrangendo aplicações tanto em laboratórios médicos quanto veterinários (Paoli, 2005). Contudo, ainda não existe uma fórmula

* Autor para correspondência: labovirfavetuece@yahoo.com.br

padrão e universal que determine a eficiência da estocagem e preservação de micro-organismos a longo prazo (Costa, 2010), levando-se em consideração que essa preservação deve garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células microbianas (Quinn et al., 2005).

Assim, a eleição do procedimento mais adequado à conservação de amostras deve ser norteada pelas características do espécime em estudo, bem como, pelas vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis. A criopreservação, aspecto aplicado da criobiologia, é o resultado do emprego de métodos que permitem a manutenção de uma variedade de tipos celulares ou organismos em condições de baixas temperaturas. Muitas células, tecidos e micro-organismos para os quais há uma crescente demanda, ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, fazendo da Criobiologia uma área da ciência com significativo potencial para o desenvolvimento de pesquisas (Costa, 2010).

Nesse sentido, a presente revisão tem como objetivo discutir os princípios básicos da Criomicrobiologia, com enfoque na preservação dos variados tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores, tomando como base estudos disponíveis na literatura científica.

CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIMES MICROBIOLÓGICOS

Os micro-organismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas, capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Sua presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas. Aliado a isso, os micro-organismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável, contribuindo para a descoberta de novos fármacos e aplicações na saúde, agricultura, indústria e meio ambiente, através de estratégias tradicionais de isolamento e seleção microbianos (Oliveira et al., 2006).

A estocagem de micro-organismos é um processo complexo, em virtude do quase inexpressivo conhecimento que se tem à respeito das reações e modificações morfo-fisiológicas processadas nestes organismos, no intuito de sobreviver e se adequar às novas condições, quando submetidos a mudanças de habitat. Estes obstáculos estimulam e elevam a quantidade de pesquisas desenvolvidas em

laboratórios de todo mundo, sobretudo, pela importância que algumas espécies vêm ganhando em virtude de enfermidades e outros prejuízos ocasionados, tanto na Medicina Veterinária quanto Humana (Brilhante et al., 2004; Girão et al., 2004).

Em muitas situações de pesquisa, é comum que as oportunidades de acesso às amostras sejam limitadas e susceptíveis a mudanças de condições capazes de inviabilizar definitivamente a obtenção das mesmas. Por conseguinte, é imprescindível a manutenção e armazenamento cuidadosos, empregando-se técnicas e protocolos que tenham sido validados previamente, pois o processo de estocagem ou composição de bancos de amostras, em si, pode afetar a qualidade dos exemplares e definir sua perspectiva de utilização posterior. Dessa forma, a maior preocupação quanto aos métodos de preservação, como por exemplo a criopreservação, reside nos efeitos sobre a estabilidade dos espécimes (Holland et al., 2003).

Com a finalidade de garantir a reprodução e a continuidade dos processos de investigação biomédica, os cientistas encaram a tarefa de estabilizar geneticamente as células. Subculturas seriadas consomem tempo e podem levar a contaminações ou tendem geneticamente a diminuir porções da população selecionada. No entanto, a população de células pode ser estabilizada, quando expostas a temperaturas criogênicas, técnica conhecida como criopreservação. Avanços científicos têm levado ao desenvolvimento de métodos que permitem manter viável, em baixas temperaturas, diferentes tipos celulares. Muitas técnicas de criopreservação vêm sendo utilizadas para a preservação de micro-organismos, células teciduais isoladas, pequenos organismos multicelulares e, alguns organismos mais complexos, como, por exemplo, embriões (Simione, 1998).

As novas técnicas de estocagem visam adequar o melhor método de preservação para cada micro-organismo, possibilitando metodologias espécie-específicas e vislumbrando a preservação de cepas a longo prazo, seja em temperatura ambiente ou em freezer. Objetivam, ainda, a manutenção do seu padrão genético, morfológico, bioquímico ou fisiológico, impedindo alterações nos componentes da parede celular e perda de virulência. Atualmente, boa parte dos bancos de coleções faz uso de pelo menos duas metodologias de estocagem, visando garantir a viabilidade e manutenção das cepas (Silva et al., 1994; Brilhante et al., 2004; Girão et al., 2004).

A remoção da água de materiais biológicos viáveis

por meio de liofilização proporciona um meio de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza. A técnica de liofilização é bastante utilizada em metodologias científicas que visam manter a atividade celular intacta por meio da diminuição do seu metabolismo, ou seja, induzir dormência ao máximo possível. As principais vantagens dessa técnica são a facilidade na manutenção e armazenamento das culturas e garantia da estabilidade das características morfológicas e bioquímicas das células estocadas (Croan, 2000; Lima, 2011). No entanto, algumas células podem sofrer danos irreversíveis durante a liofilização, fenômeno este denominado lioinjúria (Daemen & Van Der Stege, 1982; Horaczek & Viernstein, 2004).

Considerando que a tecnologia de refrigeração promove um significativo retardo nas taxas de deterioração de bens perecíveis, o uso de temperaturas muito mais baixas, como ocorre na criopreservação, tem favorecido a estocagem de organismos vivos por extensos períodos. A criopreservação é uma das técnicas mais largamente empregadas na conservação da biodiversidade microbiana. Essa é uma das chaves para a realização dos serviços de coleção de culturas microbiológicas (Day & McLellan, 1995; Myamoto-Shinohara et al., 2000; Paoli, 2005).

CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação compreende a estocagem de material a baixas (-20 °C a -80 °C em freezer) e a ultra-baixas temperaturas (-150 °C em nitrogênio líquido). No último caso, o processo ocorre na fase líquida ou de vapor do nitrogênio. Os sistemas de nitrogênio líquido permitem o armazenamento a temperaturas totalmente constantes, enquanto o freezer mecânico está sujeito a variações de temperatura capazes de comprometer a qualidade das amostras estocadas (Su et al., 1996; Wolfe & Bryant, 2001; Paoli, 2005). Vysekantsev e colaboradores (2005) demonstraram que, mesmo em sistemas de criopreservação a temperaturas ultra-baixas, uma mudança cíclica da temperatura de -196 °C até -130 °C ou -100 °C implica na morte dos micro-organismos armazenados. Este fato deve ser levado em consideração ante a movimentação e transporte de exemplares criopreservados.

O objetivo maior dessa técnica é minimizar o dano a materiais biológicos, incluindo tecidos, células animais e vegetais, bactérias, fungos e vírus, reduzindo a taxa metabólica, durante o processo de congelação e estocagem a frio. A técnica de criopreservação é a metodologia de escolha em

muitos bancos de micro-organismos, pois oferece uma contínua fonte de tecidos e células vivas geneticamente estáveis para uma variedade de fins, incluindo pesquisas e processos biomédicos (Brockbank et al., 2007).

À proporção que a temperatura se aproxima de 0 °C, a atividade metabólica celular é reduzida e a viabilidade das células se eleva. Portanto, a criopreservação interrompe a atividade celular, retornando suas funções após o descongelamento (Barbas & Mascarenhas, 2009). A célula e o meio externo atingem um estado de super-resfriamento e, em seguida, ocorre a formação de cristais de gelo no meio extracelular. O conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado, possivelmente, porque a membrana plasmática e a parede celular impedem que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem à célula e promovam o congelamento do citoplasma (Santos, 2001).

Múltiplos fatores podem afetar a efetividade da criopreservação de micro-organismos. Como os mais citados, podemos destacar a espécie a qual o exemplar pertence, o tipo de cepa, o tamanho e a forma da estrutura celular, a taxa e a fase de crescimento, o pH, a osmolaridade e a aeração, o teor de água da célula, a densidade do congelamento, a composição do meio de congelamento, a taxa de resfriamento, a temperatura e o tempo de estocagem, a taxa de descongelamento e o meio de recuperação (Day & McLellan, 1995; Kirsop & Doyle, 1991; Hubálek, 2003). Uma das condições mais importantes para o sucesso da criopreservação é a composição do meio usado para o congelamento (Hubálek, 2003).

O processo de criopreservação também exerce efeitos deletérios aos materiais biológicos, com ênfase à membrana celular e à parede celular, chamado de crioinjúria (Hubálek, 2003; Costa, 2010). Este evento letal está relacionado à formação de cristais de gelo intracelular, ao fluxo de água para fora da célula (desidratação) e ao aumento da concentração intracelular de solutos. Vale salientar que o congelamento é um processo probabilístico e, na maioria dos casos, a solução extracelular apresenta maior volume que a intracelular. Por essa e outras razões, o congelamento extracelular tende a ocorrer primeiro. Quando isso acontece, os solutos contidos no meio externo se concentram numa pequena fração de água em estado líquido, que passa a exibir maior pressão osmótica. Esse mecanismo promove o efluxo de água, promovendo o aumento de soluto intracelular e inibindo a formação de gelo. No entanto, a desidratação e a elevada contração de íons podem ser severas o bastante para causar danos

à célula (Wolfe & Bryant, 2001; Acker & Mcgann, 2003; Hubálek, 2003).

Um dos maiores desafios da criopreservação é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas, resultando em perda da permeabilidade com consequente morte da célula. A injúria mecânica sofrida pelas células advém de dois fenômenos da expansão e congelamento da água e da conformação dos cristais de gelo. Em virtude das células, especialmente as microbianas, necessitarem de um elevado teor de água no citoplasma, inibir a formação de cristais de gelo durante a criopreservação torna-se um desafio (Wolfe & Bryant, 1999). Como tentativa de reduzir ou até eliminar os danos decorrentes do congelamento aos materiais biológicos, tem sido frequente a inclusão de substâncias protetoras aos sistemas de criopreservação, conhecidas como agentes crioprotetores. Tais substâncias tem como principal função prevenir a cristalização via redução da atividade da água (Costa, 2010).

AGENTES CRIOPROTETORES

Grandes avanços no campo da criopreservação foram permitidos a partir da descoberta das propriedades crioprotetoras do glicerol por Polge em 1949 (Woods et al., 2004). Gradativamente, várias substâncias foram adicionadas à lista de crioprotetores efetivos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metanol dentre outros (Day & McLellan, 1995).

Agentes crioprotetores reduzem o estresse físico e químico derivado do congelamento e do degelo das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem abranger baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (Lima, 2011). A presença de um agente crioprotetor apropriado, na composição do meio utilizado para o congelamento, geralmente aumenta a sobrevivência de micro-organismos mantidos a temperaturas abaixo de 0°C. Esses compostos podem ser adicionados durante o crescimento do micro-organismo ou anterior ao congelamento (Hubálek, 2003).

Os agentes crioprotetores têm sido classificados de formas variadas. Uma das mais tradicionais divisões aplicadas consiste na classificação desses aditivos quanto à capacidade de penetração em materiais biológicos: crioprotetores penetrantes ou intracelulares, como metanol, etilenoglicol,

propilenoglicol, dimetilformaldeído, metilacetamida, DMSO e glicerol; e crioprotetores não penetrantes ou extracelulares, como os mono, oligo e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextrana, metilcelulose, polietilenoglicol entre outros (Meryman, 1971). As diferenças de permeabilidade dos crioprotetores afetam os mecanismos pelos quais ocorre a proteção ao material biológico. Os crioprotetores que apresentam permeabilidade efetiva são altamente hidrofílicos devido à presença de grupos químicos que formam pontes de hidrogênio com a água, como hidroxilas, amidas, sulfóxidos, carboxilas e aminas (Nash, 1966).

Os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo durante o congelamento. São particularmente apropriados à preservação de micro-organismos por se fixarem à superfície microbiana formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes celulares e membranas (Meryman, 1974; Hubálek, 2003). Entre os crioprotetores penetrantes ou intracelulares destaca-se a propriedade de realizar ligações com as moléculas de água, minimizando a formação e o tamanho dos cristais de gelo, bem como, reduzindo as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Também se caracterizam por apresentarem baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (Nash, 1966; Hubálek, 2003).

De uma forma geral, muitas substâncias com propriedades crioprotetoras elevam a permeabilidade da membrana celular, diminuem o ponto de congelamento da água e de fluidos biológicos por meio de ações coligativas. Portanto, reduzem a concentração de sais dissolvidos em solução e evitam assim o choque osmótico. Além dos efeitos coligativos, a ação crioprotetora de determinados compostos pode estar relacionada com a capacidade de defender a superfície da célula do estresse hiperosmolar. Crioprotetores também podem proteger micro-organismos e suas proteínas contra desidratação, destruição térmica e radiação (Hubálek, 2003).

Apesar dos crioprotetores serem essenciais para o congelamento seguro da maioria dos sistemas biológicos, essas substâncias não permitem a sobrevivência de todas as células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado bem como do tempo de exposição da célula ao mesmo (Oliveira, 2003).

Discutiremos a seguir uma outra classificação que também pode ser empregada aos crioprotetores, quanto a sua estrutura química. Na criomicrobiologia, os grupos de crioprotetores mais utilizados e que merecem destaque incluem os álcoois e seus derivados, os açúcares e os sulfóxidos (Hubálek, 2003).

Álcoois e derivados

Na criomicrobiologia, o principal álcool utilizado com sucesso na preservação dos mais diversos micro-organismos é o glicerol. No entanto, os álcoois de açúcares, como o etilenoglicol e o polietilenoglicol, também podem ser utilizados. Já o uso de álcoois monovalentes, como o metanol e o etanol, é pouco frequente em decorrência da elevada toxicidade a diversos sistemas biológicos (Hubálek, 2003).

O glicerol (CH₃H₈O₃) é um álcool polihídrico altamente permeável com peso molecular 92,10 g mol⁻¹ (Silva et al., 2003). Sua atividade de crioproteção foi inicialmente aplicada em 1913, quando Keith observou que a sua adição em variadas concentrações (5-42%) em suspensão de *Escherichia coli* permitiu mantê-la viável por seis meses à temperatura de -20 °C. O glicerol penetra à membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma (Parks & Graham, 1992). Sua difusão é de 30 a 60 vezes mais lenta que a da água (Graham, 1996). Os efeitos protetores do glicerol são representados por propriedades coligativas, diminuição do ponto de congelamento com conseqüente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra (Lovelock & Polge, 1954).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na preservação por congelamento. Antes dos anos 50 já se utilizava glicerol não-diluído ou na concentração de 50% para a preservação de bactérias e vírus em temperaturas entre -4 e -20 °C (Keith, 1913; Hubálek, 2003). Posteriormente, ele começou a ser utilizado nas concentrações de 2 a 55% na criopreservação de diversos vírus, como por exemplo, o bacteriófago T2 (Meyle & Kempf, 1964), bactérias, incluindo riquetsias e micoplasmas, bem como, a espécie *Leptospira interrogans* (Joyner

& Bennett, 1956; Stalheim, 1966; Summers, 1968), mixomicetos (Davis, 1965), fungos filamentosos (Davis et al., 1966), leveduras, como algumas espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* sp. (Silva et al., 2007), algas, como por exemplo, *Tetraselmis suecica* (Fenwick & Day, 1992) e protozoários, como *Theileria parva* e *Trichomonas foetus* (Levine & Marquardt, 1955; Kimbita et al., 2001) (Quadro 1).

Por outro lado, alguns autores relataram que o glicerol pode exercer efeitos tóxicos sobre as células, como alterações físico-químicas que podem levar à ruptura da membrana plasmática, à remoção de importantes proteínas membranárias, bem como, induzir modificações na estabilidade da estrutura lipídica (Watson, 1995; Curry, 2000).

O etilenoglicol (1,2-etanodiol) é um crioprotetor de baixo peso molecular (62,07 g/mol), que poderia apresentar uma baixa toxicidade e uma maior capacidade de penetração às células (Silva, 2007). É utilizado como crioprotetor na concentração média de 10%, podendo variar de 2 a 40%. Apresenta boa atividade crioprotetora na preservação de mixomicetos como *Physarella oblonga*, actinomicetos como *Actinomyces noursei*, fungos do rúmen, como *Piromyces communis*, algas como *Eisenia bicyclis* e protozoários como dinoflagelados marinhos (Hubálek, 2003) (Quadro 1).

O polietilenoglicol, também conhecido como PEG, é o polímero formado a partir do etilenoglicol. É um crioprotetor ao qual é comercializado em diferentes pesos moleculares, podendo variar de 200 a 40000. Os primeiros resultados satisfatórios apresentados na literatura com o polietilenoglicol foi com peso molecular de 1500 a 3000 na criopreservação do *Actinomyces noursei* em ciclos repetidos de congelamento e descongelamento (Konev et al., 1975). Posteriormente, o PEG foi sendo testado na criopreservação de diversos micro-organismos, obtendo-se sucesso na criopreservação da bactéria *Aerobacter aerogenes* e do protozoário *Theileria parva* (Nash, 1963; Kimbita et al., 2001) (Quadro 1).

Um problema geral dos dióis, etilenoglicol e PEG, é o fato dos mesmos agirem como solventes de alguns polissacarídeos microbianos, podendo assim ser tóxicos no processo de preservação de certos micro-organismos (Nash, 1966; Hubálek, 2003).

Quadro 1. Exemplos dos principais crioprotetores empregados na preservação de algumas espécies de micro-organismos.

Espécie do micro-organismo	Agente (s) crioprotetor (es)	Referência (s)
<i>Actinomyces noursei</i>	Etilenoglicol, PEG	Hubálek, 2003, Konev et al., 1975
<i>Aerobacter aerogenes</i>	PEG	Nash, 1963
<i>Babesia</i> sp.	DMSO	Hentrich & Bose, 1993, Hubálek, 2003
<i>Babesia rodhaini</i>	Sacarose	Dalgliesh et al., 1980, Hubálek, 2003
<i>Candida bogoriensis</i>	DMSO	Mikata & Banno, 1987
<i>Candida</i> sp.	Glicerol	Silva et al., 2007
<i>Chlamydia</i> sp.	Sacarose	Prentice & Farrant, 1977
<i>Criptococcus</i> sp.	Glicerol	Silva et al., 2007
<i>Eisenia bicyclis</i>	Etilenoglicol	Hubálek, 2003
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sacarose	Postgate & Hunter, 1961
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	DMSO	Kono et al., 1997
<i>Escherichia coli</i>	Glicerol, sacarose, DMSO	Keith, 1913, Ray et al., 1975, Sharp, 1984
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Sacarose	Chavarri et al., 1988
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Trealose	Antoni et al., 1989
<i>Leishmania tropica</i>	DMSO	Callow & Farrant, 1973
<i>Leptospira interrogans</i>	Glicerol	Stalheim, 1966
<i>Lipomyces starkeyi</i>	DMSO	Mikata & Banno, 1987
<i>Mycoplasma</i> sp.	Sacarose	(Jurmanová & Machatková, 1974)
<i>Neurospora crassa</i>	DMSO	Smith, 1983
<i>Physarella oblonga</i>	Etilenoglicol	Hubálek, 2003
<i>Piromyces communis</i>	Etilenoglicol	Hubálek, 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Trealose	Diniz-Mendes et al., 1999
<i>Saccharomyces exiguus</i>	DMSO	Mikata & Banno, 1987
Salmonella entérica	Sacarose	Sola et al, 2012
<i>Sclerospora sorghi</i>	DMSO	Smith, 1983
<i>Spirillum volutans</i>	DMSO	Pauley & Krieg, 1974
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glicerol	Fenwick & Day, 1992
<i>Theileria parva</i>	Glicerol, PEG	Kimbita et al., 2001
<i>Toxoplasma gondii</i>	DMSO	Dumas, 1974
<i>Trichomonas foetus</i>	Glicerol	Levine & Marquardt, 1955
<i>Trichosporon</i> sp.	Glicerol	Silva et al., 2007
<i>Rhodotorula</i> sp.	Glicerol	Silva et al., 2007
Vírus Bacteriófago T2	Glicerol	Meyle & Kempf, 1964
Vírus Heterosigma akashiwo (HaV)	DMSO	Nagasaki & Yamaguchi, 1999
Vírus Respiratório Sincicial	Sacarose, trealose	Steele, 1976, Gupta et al., 1996

Açúcares

Alguns açúcares mostraram ser capazes de evitar os danos causados pela desidratação celular, devido ao processo de congelamento, através da estabilização da bicamada lipídica, promovendo alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática. Acredita-se que alguns açúcares como a sacarose e a trealose estabilizem a bicamada de fosfolípidios, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e a manutenção dos lípidios numa fase fluida na ausência de água (Crowe et al., 1987; Woelders et al., 1997).

A sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) tem sido frequentemente utilizada para a criopreservação de micro-organismos em concentrações de 1-68% (média 10%). O efeito crioprotetor desse dissacarídeo foi descrito por Keith (1973), quando utilizou uma solução de cana de açúcar para a preservação de bactérias a -10 °C e as manteve por oito meses. A partir de então, a sacarose foi utilizada na preservação de muitos micro-organismos, exercendo ação crioprotetora em várias concentrações para alguns vírus, tais como o Vírus Respiratório Sincicial e o Vírus Mosaico do Feijão (Steele, 1976), bactérias, como *E. coli* (Ray et al., 1975; Sola et al.,

2012), *Enterobacter aerogenes* (Postgate & Hunter, 1961), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Chavarri et al., 1988), *Salmonella* entérica (Sola et al., 2012), fungos, como *Chlamydia* spp. (Prentice & Farrant, 1977; Hubálek, 2003), *Mycoplasma* spp. (Jurmanová & Machatková, 1974) e protozoários, como *Babesia rodhaini* (Dalgliesh et al., 1980; Hubálek, 2003), dentre outros (Quadro 1).

No entanto, a sacarose também foi ineficiente para preservação de outros micro-organismos, tais como a cianobactéria *Spirulina platensis* (Takano et al., 1973). Excepcionalmente, 5% de sacarose foi relatado por proteger cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* melhor do que glicerol a 10%, quando armazenadas entre -20 °C e -70 °C (Chavarri et al., 1988). Por outro lado, a sacarose foi tóxica para os *T. pyriformis* à temperatura ambiente (Osborne & Lee, 1975).

A trealose é um agente crioprotetor natural, presente em células de plantas e leveduras. É um dissacarídeo que apresenta duas moléculas de água em sua fórmula química (Hubálek, 2003). Ela tem sido usada nas concentrações de 5 a 19% (média 10%) na criopreservação de certos vírus, como o Vírus Respiratório Sincicial (Gupta et al., 1996), e outros agentes como o *Saccharomyces cerevisiae* (Diniz-Mendes et al., 1999), leveduras psicofílicas (Breierová, 1994), *Lactobacillus bulgaricus* (Antoni et al., 1989) e fungos micorrízicos (Declerck & Angelo-Van Coppenolle, 2000) embora os resultados com organismos eucarióticos não sejam muito satisfatórios (Hubálek, 2003) (Quadro 1).

De uma forma geral, açúcares não são capazes de se difundir através da membrana plasmática, pois atuam criando uma pressão osmótica que induz a desidratação celular, portanto, agem como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico, e conduzindo a uma baixa incidência de formação de cristais de gelo dentro da célula. Também elevam a sobrevivência de espécies no processo de criopreservação, pois podem exercer a função de solutos reduzindo o ponto de congelamento e minimizando a formação de gelo extracelular (Lima, 2011). Outro fator muito relevante ao uso de açúcares como crioprotetor é que normalmente esses aditivos apresenta baixa ou nenhuma toxicidade, mesmo adicionados em grande quantidade aos materiais biológicos (Crowe et al., 1987).

Sulfóxidos

Os sulfóxidos são tioéteres oxidados contendo um átomo de oxigênio por molécula e, ao contrário dos

outros tioéteres, são solúveis em água. A oxidação dos sulfóxidos resultam em sulfonas com dois átomos de oxigênio por molécula: a dimetilsulfona, que apresenta grande habilidade crioprotetora (Mcgann & Walterson, 1987).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto polar, com fórmula química $(CH_3)_2SO$ e que apresenta peso molecular 78.13 g/mol. Foi introduzido na criobiologia de forma muito eficaz e rapidamente foi utilizado como agente crioprotetor universal. O DMSO também apresenta propriedades radioprotetoras aos organismos. Classificado como sulfóxido, o grupamento S-O presente em sua molécula é quimicamente inerte, e é caracterizado por sua elevada eficiência e rápida penetração celular. Os primeiros estudos mostrando a atividade crioprotetora do DMSO foram desenvolvidos com eritrócitos e espermatozóides e, gradualmente, essa substância foi utilizada na criopreservação dos mais diversos micro-organismos, tanto eucariotos como procariotos (Massumoto, 1997; Hubálek, 2003).

Algumas espécies de micro-organismos são melhor criopreservadas com o uso do DMSO em comparação a outros agentes crioprotetores, como, por exemplo, o vírus *Heterosigma akashiwo* (HaV) (Nagasaki & Yamaguchi, 1999), as bactérias *Spirillum volutans* (Pauley & Krieg, 1974) e *Escherichia coli* (Sharp, 1984), as leveduras *Lipomyces starkeyi*, *Saccharomyces exiguus* e *Candida bogoriensis* (Mikata & Banno, 1987); os fungos filamentosos *Neurospora crassa* e *Sclerospora sorghi* (Smith, 1983), a alga *Enteromorpha intestinalis* (Kono et al., 1997) e os protozoários *Toxoplasma gondii* (Dumas, 1974), *Leishmania tropica* (Callow & Farrant, 1973) e *Babesia* spp. (Hentrich & Bose, 1993; Hubálek, 2003) (Quadro 1).

A literatura relata amplo uso do DMSO como crioprotetor em concentrações que variam de 1 a 32%. No entanto, devido a sua alta solubilidade em água, o DMSO apresenta como inconveniente a capacidade de causar alterações à membrana celular, as quais danificam e inviabilizam as células. E, assim, mesmo em concentrações muito baixas, pode ser tóxico a alguns sistemas biológicos, principalmente quando mantidos por longo período em temperaturas acima de 5 °C (Hubálek, 2003).

Uma concepção errônea frequentemente atribuída à Criobiologia tem sido a prerrogativa de que o sucesso dos métodos de criopreservação para uma cepa ou espécie é transferível a células ou a organismos similares. Apesar dessa afirmação ser, por vezes, verdadeira, está longe de ser uma regra.

Um exemplo que retrata bem essa afirmação é o emprego de crioprotetores para a preservação de micro-organismos, que para certas espécies favorece a conservação, enquanto para outras tem efeito tóxico, como o crioprotetor sacarose que favorece a conservação da bactéria *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, no entanto, apresenta toxicidade para a bactéria *Spirulina platensis*. As diferenças biológicas implicam respostas divergentes aos sistemas de congelamento e utilização de crioprotetores, reforçando a necessidade de se tecer ajustes ou mesmo reestruturar os critérios de preservação de acordo com o material a ser estudado (Day & McLellan, 1995).

CRIOPRESERVAÇÃO DE BACTÉRIAS

Técnicas de congelamento tornaram-se o método padronizado para a manutenção a longo prazo de culturas bacterianas. Esse método de preservação proporciona graus variados de sucesso em diferentes espécies de bactérias, não existindo ainda um método universalmente aplicável para o sucesso da preservação de todas as bactérias (Holland et al., 2003).

Os métodos de criopreservação de bactérias podem ser amplamente classificados de acordo com a temperatura de armazenamento. Temperaturas de -20 a -30 °C são possíveis com a utilização de freezer padrão de laboratório; temperatura de -70 °C, em freezer com temperatura ultra-baixa; e temperaturas no intervalo entre -140 a -196 °C, em nitrogênio líquido. O armazenamento de células em nitrogênio na fase vapor (-140 °C) ou na fase líquida (-196 °C) está cada vez mais sendo utilizado. Em temperaturas muito baixas, a viabilidade celular é quase independente do tempo de armazenamento, e acredita-se que os sistemas biológicos permaneçam geneticamente estáveis (Heckly, 1978; Paoli, 2005).

A maioria das bactérias é recuperada em clínicas médicas, no meio ambiente ou de outros espécimes (Reimer & Carroll, 2004). Após o crescimento, as culturas bacterianas são suspensas em meio líquido e processadas para armazenamento. Por causa de sua organização celular e capacidade de divisão, células bacterianas procarióticas podem ser criopreservadas ou liofilizadas (Moore et al., 2001).

Dentre os isolados bacterianos, a grande maioria pode ser facilmente mantida a -80 °C, embora o material de suspensão, a concentração do inóculo inicial e o tipo de crioprotetor usado tenham um impacto significativo na sobrevivência bacteriana e capacidade de crescimento posterior ao

descongelamento (Moore et al., 2001; Siberry et al., 2001). Tem sido demonstrada que após 12 a 18 meses, a patogenicidade de espécies comuns de bactérias armazenadas sem conservantes caiu até menos que 20% do inóculo inicial, enquanto após a adição de substâncias crioprotetoras a viabilidade aumentou 80 a 90% (Hubálek, 2003).

Após o armazenamento, é recomendado realizar um rápido descongelamento das culturas e uma rápida transferência das bactérias para um meio de crescimento adequado ao tipo bacteriano. Em geral, as bactérias podem ser armazenadas em -20 °C por um período de um a três anos, a -70 °C até 10 anos, enquanto o congelamento em nitrogênio líquido preserva bactérias por até 30 anos (Reimer & Carroll, 2004).

Infecções experimentais, utilizando bactérias armazenadas têm mostrado que as propriedades de virulência são geralmente mantidas após a liofilização ou congelamento a -70 °C (Michel & Garcia, 2003). Após o armazenamento e descongelamento, entretanto, algumas espécies bacterianas “exigentes” podem apresentar problemas em termos de viabilidade e estabilidade antigênica, molecular e propriedades bioquímicas. *Neisseria gonorrhoeae* é uma espécie de bactéria difícil de cultivar, cujas características foram estudadas após preservação. Nesses estudos, foi observado que estirpes dessa espécie podem ser armazenadas com sucesso a -20 °C ou a -70 °C usando criogênicos específicos (Harbec & Turcotte, 1996).

Helicobacter pylori é outra espécie bacteriana muito sensível às condições de armazenamento. Para preservar adequadamente a viabilidade e a característica genética e fisiológica dessa espécie bacteriana, Shahamat e colaboradores (1992) sugeriram que, para criopreservá-la, o inóculo inicial deve ser superior a 5×10^6 células/ml e pelo menos 90% das células devem estar em estado vegetativo, ou seja, células em forma de espiral à observação microscópica. Esses mesmos autores, também testaram os efeitos dos diferentes meios crioprotetores para armazenamento de bactérias a -70 °C ou em nitrogênio líquido. Embora se consiga recuperar a maioria das cepas no período de 24 meses, períodos mais longos de armazenamento reduziram significativamente o percentual de cepas viáveis após o descongelamento (cerca de 60%). Estes dados confirmam que as espécies selecionadas de bactérias são particularmente frágeis após o armazenamento a longo prazo e que protocolos específicos objetivando a melhoraria da sua sobrevivência ainda são necessários.

Micoplasmas e clamídias diferem das bactérias comumente encontradas em espécimes biológicos e ambientais em virtude da sua composição celular, ausência de marcação com a coloração de Gram e suas características de crescimento especiais in vivo e in vitro. Alguns trabalhos científicos têm demonstrado que, apesar do seu crescimento peculiar e exigências metabólicas, micoplasmas e clamídias podem ser armazenadas com sucesso em frascos criopreservados ou liofilizados por até 10 anos (Furr & Taylor-Robinson, 1990; Theunissen et al., 1993). No entanto, a criopreservação de espécies de clamídia pode reduzir significativamente a recuperação após o período de armazenamento, sugerindo que a criopreservação destas espécies podem exigir ajustes quanto ao inóculo inicial e otimização dos protocolos de congelamento (Theunissen et al., 1993).

A técnica de liofilização também é recomendada para a conservação de bactérias. A taxa de sobrevivência pós-liofilização de algumas bactérias foi mensurada por Miyamoto-Shinohara e colaboradores (2000). Esses autores mostraram que a taxa de sobrevivência após dez anos de armazenamento variou significativamente de acordo com a espécie testada. A taxa de sobrevivência de bactérias Gram-positivas foi geralmente superior do que a de bactérias Gram-negativas, provavelmente por causa da sua maior resistência à secagem, devido à composição estrutural de sua superfície.

CRIOPRESERVAÇÃO DE FUNGOS

Infecções fúngicas pouco comuns estão emergindo como importantes causas de morbidade e mortalidade em hospedeiros humanos e animais imunocomprometidos e, assim, representam problemas especiais para laboratórios de diagnóstico. Outra importância dada aos fungos são que eles possuem um enorme potencial para fornecer soluções na agricultura, meio ambiente, medicina humana e veterinária. Estas razões explicam o grande interesse na preservação desses micro-organismos. Inúmeros protocolos têm sido sugeridos por serem adequados na preservação de fungos, embora nenhuma técnica de preservação individual tenha sido aplicada com sucesso para todos os fungos (Crespo et al., 2000; Deshmukh, 2003; Smith & Ryan, 2003; Espinel-Ingroff et al., 2004).

Das diversas metodologias de estocagem fúngica utilizadas nos centros de pesquisa em todo o mundo, algumas têm maior destaque por motivos variados, como a praticidade ou resultados satisfatórios para determinadas espécies. A escolha de um método

mais adequado deve considerar parâmetros, como o objetivo do estoque e da coleção e a manutenção das estabilidades genética, fisiológica e morfológica (Bueno & Gallardo, 1998).

Como primeiro passo para a preservação, culturas fúngicas são obtidas por técnicas de amostragem convencionais e são normalmente cultivadas em Agar Sabouraud, porém outros meios de crescimento também estão amplamente descritos na literatura (Murray et al., 1999). Normalmente, é obtida uma quantidade celular suficiente para estabelecer um biobanco de leveduras após incubação de 48-72 horas na atmosfera aeróbica, enquanto fungos filamentosos podem requerer 7-12 dias de incubação. Embora alguns agentes crioprotetores tenham sido utilizados para facilitar a dispersão de fungos, a dificuldade na obtenção de suspensões homogêneas após cultura pode comprometer a possibilidade de preparação de uma suspensão fúngica adequada para o congelamento (Crespo et al., 2000).

Para formação de biobancos de fungos, a literatura referencia métodos como estocagem em solo, em óleo mineral, em água destilada estéril, congelamento (criopreservação) em temperaturas variadas (-20, -70 e -196 oC) e a liofilização, todos com uso ou não de agentes crioprotetores nas mais diversas concentrações e tipos (Bueno & Gallardo, 1998). No entanto, a criopreservação em nitrogênio líquido e a liofilização são os métodos recomendados por vários centros de estudo para manutenção de coleções de culturas incluindo The American Type Culture Collection (ATCC) e National Collection of Types Cultures (American Type Culture Collection, 1991; Morgan et al., 2006).

A criopreservação utilizando temperaturas ultra-baixas permite que a maioria das culturas permaneça estável por um grande período, podendo chegar até a 30 anos, devido à baixa ocorrência de atividade metabólica nestas temperaturas. Esse é um dos principais motivos que justifica ser esta a técnica mais utilizada na maioria dos biobancos microbianos (Smith & Ryan, 2003). Por outro lado, nos protocolos de criopreservação a temperaturas abaixo de 0 oC, o estresse causado aos fungos pode ser ainda maior, tendo em vista que, a temperatura na qual estes seres normalmente crescem e se multiplicam encontra-se bem acima destes parâmetros, sofrendo, os mesmos, processos de adaptação para sobrevivência ainda mais exacerbados, podendo chegar até a modificações do seu material genético (Santos, 2001; Hubálek, 2003; Girão et al., 2004). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, genes de indução ao congelamento severo

foram identificados, um deles (NSR1) codifica uma proteína relacionada ao processamento do RNAr e biossíntese ribossomal (Kondo et al., 1992). Outros genes são induzidos pelo choque térmico ao frio (Kondo & Inouye, 1991; Kowalski et al., 1995).

Para algumas espécies de Ascomycota, Zigomycota e Basidiomycota, a técnica de liofilização é mais adequada, proporcionando uma boa sobrevivência por até 30 anos para alguns isolados (Smith & Ryan, 2003). A principal vantagem dessa técnica é que ampolas seladas oferecem uma proteção consistente aos fungos contra a dispersão no ar durante o armazenamento ou durante o acondicionamento e transporte para laboratórios distantes. Em contrapartida, a liofilização apresenta uma grande desvantagem que é a lioinjúria, podendo causar danos genéticos durante as etapas de resfriamento e secagem (Tan, 1997; Ryan et al., 2001).

Devido as técnicas de criopreservação e liofilização para a preservação de culturas fúngicas poderem causar problemas de viabilidade após a reconstituição, é de grande importância verificar a viabilidade antes e depois do armazenamento, independentemente da técnica utilizada. Protocolos experimentais de armazenamento de culturas de fungos têm estabelecido que a viabilidade aceitável para fungos é a germinação e desenvolvimento dos propágulos/células a uma taxa acima de 75% (Smith & Ryan, 2003).

Embora a maioria dos fungos possa ser preservados com a utilização das técnicas anteriormente mencionadas, alguns não apresentam resultados satisfatórios. Exemplos desse caso frequentemente incluem fungos que não esporulam em cultura, como o Oomycota, ou possuem esporos excessivamente delicados e grandes, e outros que são difíceis de manutenção em cultura (*Diplocarpon*) ou são patógenos facultativos (Figueiredo, 2001; Smith & Ryan, 2003).

CRIOPRESERVAÇÃO DE VÍRUS

Os vírus são acelulares, muito menores e menos complexos bioquimicamente que os mais simples organismos unicelulares. Eles consistem de uma única molécula de RNA ou DNA, ou, em alguns casos, de um genoma segmentado, envolvido por uma ou mais proteínas. Esta relativa simplicidade estrutural dos vírus tem sido em parte o segredo do sucesso dos mesmos coexistirem com todas as formas de vida conhecidas (Gould, 1995).

Existe uma variedade de procedimentos que objetivam manter estoques de vírus e, estes,

dependem, de certo modo, das propriedades peculiares do vírus em particular (Gould, 1995). Em geral, os vírus DNA são mais estáveis que os vírus RNA, porém ambos são extremamente estáveis e podem ser preservados de forma relativamente simples. Muitos vírus podem ser mantidos por meses em temperaturas de refrigeração e armazenados por anos em temperaturas muito baixas, sem a necessidade da utilização de substâncias protetoras ou de técnicas de congelamento lento. A estrutura simples, o pequeno tamanho e a ausência de água livre dos vírus são em grande parte responsáveis por essa estabilidade (Day & McLellan, 1995; Gould, 1999). Há uma tendência dos vírus com envelopes lipídicos serem menos estáveis que os vírus não envelopados à temperatura ambiente, no entanto, eles sobrevivem bem em temperaturas ultra-baixas ou no estado liofilizado (Gould, 1995).

As infecções virais e sua natureza patogênica, bem como, a ausência de opções terapêuticas capazes de erradicar muitas infecções virais, requerem precauções especiais de biossegurança para manipulação das amostras biológicas. Primeiro, os laboratórios de manipulação de vírus devem adotar nível de biossegurança II ou III em suas instalações dependendo do tipo de vírus a ser manipulado, em segundo lugar, biobancos com estoques virais exigem pessoal experiente adotando orientações, internacionalmente aceitas no guia de biossegurança (Paoli, 2005).

Importantes regras gerais necessárias para a preservação adequada de vírus foram pontuadas por Gould (1999). Preparações virais liofilizadas podem ser mantidas por décadas a 4 °C. No entanto, pode ser detectada considerável infectividade residual em modelos virais experimentais de liofilização tanto entre vírus envelopados quanto não-envelopados (Uhlenhaut, 2005). Vírus armazenados em nitrogênio líquido mantém suas propriedades patogênicas. As condições de armazenamento dos vírus podem variar de acordo com o destino final do material preservado. Se a manutenção da infectividade do vírus não é essencial, por exemplo, quando a amostra é usada para obter preparações antigênicas, ela pode ser armazenada com segurança à temperatura de -20 °C (Gould, 1999). Proteínas adicionadas ao biobanco de estoque viral, como por exemplo a albumina, podem fornecer proteção à infectividade do vírus em amostras armazenadas. No entanto, os mecanismos responsáveis por tal proteção ainda não são completamente conhecidos. Uma hipótese sugere que as proteínas fornecem capacidade de tampão contra mudanças de pH e reduz os processos que danificam os ácidos nucleicos. A infectividade viral mantém-se melhor

quando as amostras são criopreservadas em pequenos volumes, pois o congelamento e descongelamento das amostras ocorrem muito mais rápido e os vírus são menos danificados quando preparações contêm alta titulação viral (Gould, 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento, a identificação, a seleção, a caracterização, a conservação e a posterior utilização de micro-organismos são práticas imprescindíveis para o desenvolvimento de processos e obtenção de produtos de interesse econômico, bem como, para prática laboratorial com fins diagnósticos e de pesquisa.

No entanto, apesar de existir uma variedade de protocolos de estocagem e preservação com aplicação específica a diversos micro-organismos, proposto por muitos autores, persiste a necessidade de se aperfeiçoar os já existentes e de se criar novos protocolos capazes de promover maior proteção a cada micro-organismo, em particular no que se refere à criopreservação.

Importante destacar a escassez de trabalhos específicos publicados na área de criopreservação de muitos micro-organismos, aliado à expressiva importância da estocagem microbiológica. Essa realidade evidencia a importância de estudos sobre o tema e mostra a necessidade urgente de investimento de pesquisa sobre o tema.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudos do doutorando Antônio Cavalcante Mota Filho, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisadora à Lúcia Daniel Machado da Silva e apoio financeiro para o desenvolvimento das pesquisas do Laboratório de Reprodução de Carnívoros.

REFERÊNCIAS

Acker, J. P. & Mcgann, L. E. 2003. Protective Effect Of Intracellular Ice During Freezing? *Cryobiol.* 46:197-202.

American Type Culture Collection. 1991. Preservation methods: freezing and freeze-drying. 2th ed., American Type Culture Collection, Rockville, MD.

Antoni, G.L., Perez, P., Abraham, A., Anón M.C. 1989. Trehalose, A Cryoprotectant For *Lactobacillus bulgaricus*, *Cryobiology.* 26:149-153.

Barbas, J.P. & Mascarenhas, E.R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 10:49-62.

Breierová, E. 1994. Cryoprotection of psychrophilic yeast species by the use of additives with cryoprotective media, *Cryo-Letters.* 15:191-197.

Brilhante, R.S.N., Cavalcante, C.S.P., Soares-Junior, F.A., Monteiro, A.J., Brito, E.H.S., Cordeiro, R.A., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2004. Evaluation of *Microsporium canis* in different methods of storage. *Medical Mycology.* 42:499-504.

Brockbank, K. G. M., Covault, J. C., Taylor, M. J. 2007. Guide Cryopreservation. Part 1: Cryobiology and Cryopreservation. *Thermo Fisher Scientific Inc.* p.1-9.

Bueno, L. & Gallardo, R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoam. Micol.* 15:166-168.

Callow, L.L. & Farrant. J. 1973. Cryopreservation of the promastigote form of *Leishmania tropica* var. major at different cooling rates. *Int. J. Parasitol.* 3:77-88.

Chavarri, F.J., Paz, M., Nueez, M.M. 1988. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains, *Biotechnol. Lett.* 10, 11-16.

Colwell, R.R. 1992. Selected cryopreservatives for long-term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. *J. Clin. Pathol.* 45:735-736.

Costa, E.C. 2010. *Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação.* 115p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.

Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2000. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. *J Clin Microbiol.* 38 (6):2383-2385.

Croan, S.C. 2000. Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting Basidiomycotina. *Mycologia.* 92:810-817.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F. 1987. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242:1-10.

Curry, M.R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod.* 5:46-52.

Daemen, A.L.H. & Van Der Stege, H.J. 1982. 1 - The destruction of enzymes and bacteria during the spray drying of milk and whey. 2 - The effect of the drying conditions. *Neth. Milk Dairy J.* 36:211-229.

Dalgliesh, R.J., Mellors, L.T., Blight, G.W. 1980. Comparison of glucose, sucrose and dimethylsulfoxide as cryoprotective agents for *Babesia rodhaini*, with estimates of survival rates, *Cryobiology.* 17:410-417.

Davis, E.E. 1965. Preservation of myxomycetes, *Mycologia.* 57:986-988.

- Davis, E.E. Hodges, F.A., Goos, R.D. 1966. Effect of suspending media on the survival of *Puccinia graminis* urediospores during freezing, *Phytopathology*. 56:1432-1433.
- Day, J. G. & McLellan, M. R. 1995. *Cryopreservation and Freezing-Drying Protocols*. New Jersey: Humana Press.
- Declerck, S. & Angelo-Van Coppenolle, M.G. 2000. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *New Phytol.* 148:169-176.
- Deshmukh, S.K. 2003. The maintenance and preservation of keratinophytic fungi and related dermatophytes. *Mycoses*. 46:203-207.
- Diniz-Mendes, L., Bernardes, E., Araujo, P.S., Panek, A.D., Paschoalin, V.M.F. 1999. Preservation of frozen yeast cells by trehalose, *Biotechnol. Bioengin.* 65:572-578.
- Dumas, N. 1974. Conservation aux basses temperatures de *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux, 1909: action du dimeethyl-sulfoxyde. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 49:1-40.
- Espinel-Ingroff, A., Montero, D., Martin-Mazuelos, E. 2004. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1257-1259.
- Figueiredo, M. B. 2001. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*. 63 (1/2):73-82.
- Fenwick, C. & Day, J. G. 1992. Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes, *J. Appl. Phycol.* 4:105-109.
- Furr, P.M. & Taylor-Robinson, 1990. D. Long-term viability of stored mycoplasmas and ureaplasmas. *J. Med. Microbiol.* 31:203-206.
- Girão, M.D., Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2004. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Rev Soc Bras Med Trop.* 37 (3):229-233.
- Graham, J.K. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Am.*, 12:131-147.
- Gould, E. A. 1995. *Virus Cryopreservation and Storage*. In: Day, J.G., McLellan, M. R. *Cryopreservation and Freezing-Drying Protocols*. New Jersey: Humana Press, p. 7-20.
- Gould, E. A. 1999. Methods for long-term vírus preservation. *Mol. Biotechnol.* 13: 57-66.
- Gupta, C.K., Leszczynski, J., Gupta, R.K., Siber, G.R. 1996. Stabilization Of respiratory syncytial virus (rsv) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of rsv vaccines and immune globulin, *Vaccine*. 14: 1417-1420.
- Heckly, R. J. 1978. Preservation of micro-organisms. *Adv. Appl. Microb.* 3:1-76.
- Harbec, P. S. & Turcotte, P. 1996. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at -20 °C. *J. Clin. Microbiol.* 34:1143-1146.
- Hentrich, B. & Bose. R. 1993. Cryopreservation of *Babesia divergens* from jirds as a live vaccine for cattle. *Internat. J. Parasitol.* 23:771-776.
- Horaczek, A. & Viernstein, H. 2004. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biol Control.* 31:65-71.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol.* 46:205-229.
- Holland, N. T., Smith, M. T., Eskenazi, B., Bastaki, M. 2003. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res.* 543:217-234.
- Joyner, L.P. & Bennett, G.H. 1956. Observations on the viability of *Trichomonas foetus* during the process of freezing to -79 °C and thawing in presence of glycerol, *J. Hyg.* 54:335-341.
- Jurmanová, K. & Machatková, M. 1974. Preservation of *Mycoplasma* strains by freezing in solid carbon dioxide, liquid nitrogen and at -10 °C, *In Vitro v CSSR* 3, n. 2:213-216.
- Keith, S.C. 1913. Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water, *Science.* 37:877-879.
- Kimbita, E.N. Silayo, R.S. Dolan, T.T. 2001. Comparison of cryoprotectants in the preservation of *Theileria parva* sporozoites using an in vitro infectivity assay, *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 33:29-41.
- Kirsop, B. E. & Doyle, A. 1991. *Maintenance of microorganisms and cultured cells*. 2th.ed. London: Academic Press.
- Kondo, K. & Inouye, M. 1991. TIP1, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266:17537-17544.
- Kondo, K., Kowalski, L.R., Inouye, M.J. 1992. Cold shock induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing. *J. Biol. Chem.* 267:16259-16265.
- Konev, J.E., Zhilina, Z.A., Chamin, N.H. 1975. Some aspects of polyalcohols used as cryoprotective agents in the storage of *Actinomyces noursei* LIA-0471 (in Russian), *Antibiotiki.* 20:342-345.
- Kono, S., Kuwano, K., Ninomyia, M., Onishi, J., Saga, N. 1997. Cryopreservation of *Enteromorpha intestinalis* (Ulvales, Chlorophyta) in liquid nitrogen, *Phycologia.* 36:76-78.
- Kowalsky, L.R.Z., Kondo, K., Inouye, M. 1995. Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 15:341-353.
- Kudokotseva, E. V., Koshchiy, S. V., Groshevoy, M. I. 2005. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. *Cryo Letters.* 26(6):401-408.
- Levine, N.D. & Marquardt, W.C. 1955. The effect of glycerol and related compounds on survival of *Trichomonas foetus* at freezing temperatures, *J. Protozool.* 2:100-107.
- Lima, D. T. 2011. *Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas*. 120p. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

- Lovelock, J.E. & Polge, C. 1954. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Byochem J.* 58:318-322.
- Massumoto, C. M., Mizukami, S., Campos, M.F., Silva, L. A. G., Mendrome, J. R. A., Sakashita, A., Zambon, E., Ostronoff, M., Macedo, M. C. A., Medeiros, R., Dorlhiac, P., Chamone, D., Dulley, F. 1997. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. *Rev Ass Med Bras.* 43:93-98.
- Mcgann, L. E. & Walterson, M. L. 1987. Cryoprotection by dimethylsulfoxide and dimethylsulfone. *Cryobiol.* 24:11-16.
- Meryman, H. T. 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiol.* 8:173-183.
- Meryman, H.T. 1974. Freezing injury and its prevention in living cells, *Annu. Rev. Bioph. Bioeng.* 3:341-363.
- Meyle, J.S. & Kempf, J.E. 1964. Preservation of T2 bacteriophage with liquid nitrogen, *Appl. Microbiol.* 12:400-402.
- Michel, C. & Garcia, C. 2003. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet. Res.* 34:127-132.
- Mikata, K. & Banno, I. 1987. Preservation of yeast cultures by freezing at -80 °C, *IFO Res. Commun. (Osaka)*, 13:59-68.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S. And Komatsu, Y. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiol.* 41:251-255.
- Moore, J.E., Shaw, A.B., Stanley, T., Crowe, M.J., Elborn, J.S. 2001. Long-term preservation of strains of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp. and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients with cystic fibrosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 82-83.
- Morgan, C.A., Heerman, N., White, P.A., Vesey, G. 2006. Preservation of microorganisms by drying: a review. *J Microbiol Meth.* 66:183-193.
- Murray, P., Baron, E.J., Pfaller, M., Tenover, F., Tenover, R., (Eds) 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press: Washington.
- Myamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Marakami, Y., Kawamura, S., Komatsu, Y. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiol.* 41:251-255.
- Nagasaki, K. & Yamaguchi, M. 1999. Cryopreservation of a virus (HaV) infecting a harmful bloom causing microalga, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), *Fish. Sci.* 65:319-320.
- Nash, T. 1966. *Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells agein damage due to freezing and thawing*. In: Meryman, H. T. *Cryobiology*. London-New York: Academic Press.
- Nash, T., Postgate, J.R., Hunter, J.R. 1963. Similar effects of various neutral solutes on the survival of *Aerobacter aerogenes* and of red blood cells after freezing and thawing, *Nature.* 199:1113.
- Oliveira, E.C.S. 2003. *Efeito de diferentes diluidores sobre a congelação do sêmen canino*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 61p.
- Oliveira, V.M., Sette, L.D., Fantinatti-Garboggini, F. 2006. *Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos*. Divisão de Recursos Microbianos. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p.1-19.
- Osborne, J.A. & Lee, D. 1975. Studies on the conditions required for optimum recovery of *Tetrahymena pyriformis* strain S (phenoset A) after freezing to, and thawing from, -196 °C, *J. Protozool.* 22:233-237.
- Paoli, P. 2005. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev.* 29:897-910.
- Parks, E.J. & Graham, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38:209-222.
- Pauley, E.H. & Krieg. N.R. 1974. Long-term preservation of *Spirillum volutans*. *Int. J. Syst. Bact.* 24:292-293.
- Postgate, J.R. & Hunter, J.R. 1961. On the survival of frozen bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 26:367-378.
- Prentice, M.J. & Farrant, J. 1977. Survival of chlamydiae after cooling to -196 °C, *J. Clin. Microbiol.* 6:4-9.
- Quinn, P.J. Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. 2005. *Microbiologia e Doenças Infecciosas*, Porto Alegre, Artmed. 512p.
- Ray, B., Souzu, H., Speck, M.L. 1975. Cryoprotection of *Escherichia coli* by penetrating and nonpenetrating cryopreservatives, *Cryobiol.* 12: 553.
- Reimer, L. & Carroll, K. 2004. *Procedures for the storage of microorganisms In: Manual of Clinical Microbiology* (Murray, E., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F. and Tenover, R., Eds.), ASM Press, Washington, DC, p.67-73.
- Ryan, M.J., Jeries, P., Bridge, P.D. and Smith, D. 2001. Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function. *Cryo Lett.* 22:115-124.
- Santos, I.R.I. 2001. *Criopreservação de germoplasma vegetal: a alternativa para a conservação a longo prazo*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 20:60-65.
- Shahamat, M., Paszko-Kolva, C., Mai, U.E.H., Yamamoto, H., Theunissen, J.J., Stolz, E., Michel, M.F. 1992. The effects of medium and rate of freezing on the survival of chlamydias after lyophilization. *J. Appl. Bacteriol.* 75:473-477.
- Sharp, R.J. 1984. The preservation of genetically unstable microorganisms and the cryopreservation of fermentation seed cultures, *Adv. Biotechnol. Progr.* 3:81-109.
- Siberry, G., Brahmadathan, K.N., Pandian, R., Lalitha, M.K., Steinhoff, M.C., John, T.J. 2001. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull World Health Organ.* 79:43-47.
- Silva, A.M.M., Borba, C.M., Oliveira, P.C. 1994. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. *Mycoses.* 37:165-169.

- Silva, A.R. 2007. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Rev Bras Reprod Anim.* 31 (1):119-127.
- Silva, A.R, Cardoso, R.C.S, Uchoa, D.C, Silva, L.D.M. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59:821-829.
- Silva, J.O, Costa, P.P, Reche, S.H.C. 2008. Manutenção de leveduras por congelamento a -20 oC. *Rev Bras Anal Clin*, 40 (1):73-74.
- Simione, F.P. *Cryopreservation Manual*. Nalge International Coop, 1998. Capturado em 19 de agosto de 2011. Online. Disponível na Internet <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryo.pdf>.
- Smith, D. 1983. Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80:360-363.
- Smith, D. & Ryan, M.J. 2003. *Current status of fungal collections and their role in biotechnology* In: Handbook of fungal biotechnology, Ed., Marcel Dekker, New York, p. 527-538.
- Sola, M.C, Oliveira, A.P, Feistel, J.C., Minafra e Rezende, C.S. 2012. Manutenção de microorganismos: conservação e viabilidade, *Enciclopédia Biosfera.* 8:1398-1418.
- Stalheim, O.H.V. 1971. Viable, avirulent *Leptospira interrogans* serotype pomona vaccine: preservation in liquid nitrogen, *Appl. Microbiol.* 22:726-727.
- Steele, P.R.M. 1976. Prevention of low temperature denaturation injury in T4Bo phage by low concentrations of traditional cryoprotective additives, *J. Hyg.* 76:453-458.
- Su, S.C., Garbers, S., Rieper, T.D. Toniolo, P. 1996. Temperature variations in upright mechanical freezers, *Cancer Epidem Biomar.* 5:139-140.
- Summers, W.A. 1968. Preservation of infectivity of *Anaplasma marginale*, *Am. J. Vet. Res.* 29:1489-1490.
- Tan, C.S. 1997. Preservation of fungi. *Cryptogamie Mycol.* 18:157-163.
- Takano, M, Sado, J.I., Ogawa, T., Terui, G. 1973. Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis*, *Cryobiol.* 10:440-444.
- Theunissen, J.J., Stolz, E. and Michel, M.F. 1993. The effects of medium and rate of freezing on the survival of chlamydias after lyophilization. *J. Appl. Bacteriol.* 75:473-477.
- Uhlenhaut, C., Dörner, T., Pauli, G., Pruss, A. 2005. Effect of lyophilization on the infectivity of enveloped and non-enveloped viruses in bone tissue. *Biomaterials*, 26:6558-6564.
- Vysekantsev, I. P., Gurina, T. M., Martsenyuk, V. F., Petrenko, T. F., Kudokotseva, E. V., Koshchiy, S. V., Groshevoy, M. I. 2005. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. *Cryo Letters.* 26:401-408.
- Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:871-891.
- Woelders, H., Mathijis, A., Engel, B. 1997. Effects of trealose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness of sperm after freezing and thawing. *Cryobiol.* 35:193-195.
- Wolfe, J. & Bryant, G. 1999. Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiol.* 39:103-129.
- Wolfe, J. & Bryant, G. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *Int J Refrig.* 24:438-450.
- Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y., Critser, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiol.* 48:146-156.