
Desafios na Criopreservação de Leveduras

Cirlene da Cunha CALDAS; Dulcilena de Matos CASTRO e SILVA

Núcleo de Micologia-Centro de Parasitologia-Instituto Adolfo Lutz

O reconhecimento da relevância da biodiversidade fúngica para o desenvolvimento da biotecnologia e outras áreas da microbiologia tem conduzido estudos sobre técnicas de conservação dos mais diversos micro-organismos. Contudo, ainda não existe uma fórmula ideal que garanta a eficiência da estocagem e preservação, a longo prazo, de leveduras de interesse médico. Este fato é observado com diversas espécies de fungos que ainda esperam por metodologia padronizada e adequada à sua conservação, fazendo da manutenção um campo de vasto potencial para desenvolvimento de pesquisas tecno-científicas¹.

Estudos com micro-organismos estocados representam importantes fontes de recursos genéticos para avanço biotecnológico e desenvolvimento econômico sustentável, podendo contribuir com a descoberta de novos fármacos e aplicações para a saúde e meio ambiente, através de estratégias de isolamento e seleção². Devido a emergente importância atribuída à estocagem de amostras biológicas que muitas instituições têm investido na construção de coleções de micro-organismos. A escolha da técnica depende das características dos agentes, das características dos métodos, dos custos de manutenção, da importância do acervo e, principalmente, da disponibilidade de equipamentos³.

Após a caracterização fenotípica e/ou genotípica da amostra, recomenda-se a utilização de métodos que garantam a qualidade da mesma a médio e longo prazo, pois após algum tempo o método de preservação pode levar a alterações significativas para como, por exemplo, o pleomorfismo e surgimento de contaminação que são bastante comuns¹.

A criopreservação, seguida pela liofilização, parece ser o método mais recomendado e viável em laboratório para a manutenção de cepas de leveduras. Outros métodos também podem ser utilizados para este grupo, porém após a recuperação

da cepa esta pode não apresentar as características originais, tais como capacidade de esporulação e patogenicidade². Um dos maiores desafios é realizar o congelamento da amostra sem 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 e conseqüente morte celular. Para congelar um micro-organismo é necessária uma solução para suspensão e um composto crioprotetor. Os crioprotetores podem penetrar, ou não, no material celular e são capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, prevenindo a formação de cristais de gelo durante o congelamento⁴. O glicerol, além de fácil aquisição e simples manuseio é o criopreservante mais utilizado em banco de cepas mantidas na criopreservação a -20°C . Podem ser utilizados para solução de suspensão, ainda, leite desnatado, dimetilsulfóxido (DMSO) ou água destilada. O leite desnatado apresenta baixo custo e boa recuperação dos micro-organismos. O DMSO também é utilizado para congelamento de células, porém, é tóxico para algumas moléculas. A concentração do crioprotetor pode ser influenciada por outros componentes do diluente, pelo padrão de resfriamento, pelos métodos de congelamento e descongelamento⁵. Existe uma perda previsível de cepas mantidas sob criopreservação à -20°C , relacionada com a utilização de glicerol, ou DMSO, em altas concentrações, devido a efeitos tóxicos e, portanto, deletérios aos micro-organismos, constituindo-se um obstáculo na sobrevivência das estirpes durante o congelamento. A concentração ideal de glicerol deve ser aquela em que há predominância de efeitos protetores sobre efeitos tóxicos⁶.

Para proteger o material celular existem compostos protetores extracelulares, como a lactose e outros carboidratos, que promovem a vitrificação da célula durante o congelamento, tornando a membrana mais plástica, causando menos

desidratação, diminuindo a toxicidade por sais e evitando a formação de cristais. A nível molecular, os carboidratos substituem as moléculas de água na estrutura das proteínas impedindo o colapso celular². Os carboidratos são bastante utilizados e adicionados em meio de cultura com resultados variáveis. O soro e sangue são específicos para algumas moléculas⁴.

No protocolo de liofilização, solução de lactose e aminoácido, glutamato de sódio, tem sido utilizado para suspensão de micro-organismos com resultados de grande viabilidade; essa estratégia tem sido, recentemente, utilizada também para criopreservação de alguns micro-organismos. A utilização de aminoácidos melhora a viabilidade, pois neutraliza as reações entre os grupos amino e carboxila funcionando como um tampão da umidade residual⁴.

Em 2008, Silva *et al.*⁴ preconizaram como protocolo de criopreservação para a manutenção de leveduras o caldo BHI como uma solução para nutrição durante as 24 h antes do congelamento, obtendo boa viabilidade das culturas. Em 2012, o Núcleo de Micologia do IAL, criou um novo protocolo em que a levedura não aguardava o tempo de 24 h no flaconete antes de ser congelada, sendo apenas o glicerol a 15% utilizado como solução crioprotetora.

A criopreservação continua sendo a metodologia de escolha para o banco de leveduras deste Núcleo, pois conduz à situação de dormência metabólica e, em consequência, as culturas se mantêm estáveis. Considerando o exposto, em 2014 foi iniciado um protocolo utilizando apenas o leite desnatado com glutamato de sódio para congelamento de leveduras, e avaliaremos futuramente se este procedimento é satisfatório para a manutenção de biobanco de leveduras.

REFERÊNCIAS

1. Aguiar TDF, Teixeira MFS, Teles CHA, Martins GR, Júnior RQB & Costa EC. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. *Acta Veterinaria Brasília*. 2012; 6(2); 80-93.
2. Lima DT. Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade Medicina da Universidade Federal do Ceará; 2011.
3. Paoli P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS microbiology reviews*. 2005; 29(5); 897-910.
4. Silva JO, Costa PP & Reche SHC. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C; Yeasts maintainance for freezing at -20°C. *Rev. bras. anal. Clin.* 2008; 40(1); 73-74.
5. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*. 1986; 23(1); 1-13.
6. Freire DM, Teles EM, Bon EP & Sant’Anna GL. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. *Applied biochemistry and biotechnology*. 1997; 63(1); 409-421.