

Ação dos crioprotetores glicose, trealose e quitosana na manutenção da viabilidade de células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* após liofilização

Action of cryoprotectors glucose, trealose and chitosan in maintaining viability of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* cells after lyophilization

Andressa Barella de Freitas^{1*} , Creciana Maria Endres^{1,2} , Daiane Martini³ ,
Andréia Paula Dal Castel⁴ 

¹Faculdade de Tecnologia SENAI, Chapecó, SC, Brasil.

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Universidade Uniderp Anhanguera, Campo Grande, MS, Brasil.

⁴Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, SC, Brasil.

*Correspondente - barellaandressa@gmail.com

Resumo

A liofilização é considerada uma das técnicas mais seguras para obtenção de estabilidade de cepas de cultura. Para este processo, podem ser utilizados crioprotetores, que são substâncias que protegem as estruturas celulares durante o período de congelamento, descongelamento e desidratação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho da glicose, trealose e quitosana como crioprotetores para manutenção de cepas de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. Para tratamento estatístico, utilizou-se ANOVA e teste de Tukey com o software Bioestat, versão 5.3. Para *Escherichia coli*, a Trealose apresentou melhores resultados após a liofilização, porém nenhum dos tratamentos mostrou-se eficaz em prolongar a viabilidade até os 60 dias de armazenamento. Para *Saccharomyces cerevisiae*, todos os tratamentos apresentaram-se satisfatórios ao longo dos 60 dias avaliados.

Palavras-chave: Conservação; estabilidade de cepas; liofilização; microrganismos.

Abstract

Lyophilization is considered one of the safest techniques for acquiring stability of culture strains. For this process, cryoprotectants, which are substances that protect cell structures during the period of freezing, thawing and dehydration, may be used. The objective of the present work was to evaluate the performance of glucose, trehalose, and chitosan as cryoprotectants for *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. For statistical treatment, ANOVA and Tukey's test were used with the software Bioestat, version 5.3. For *Escherichia coli* Trealose presented better performance after lyophilization, but none of the treatments proved to be effective in prolonging viability up to 60 days of storage. For *Saccharomyces cerevisiae* all treatments were satisfactory throughout the 60 days evaluated.

Key words: Conservation. Stability of strains. Lyophilization. Microorganisms.

Seção: Ciências Biológicas

Recebido

20 de junho de 2017.

Aceito

7 de agosto de 2019.

Publicado

5 de fevereiro de 2020

www.revistas.ufg.br/vet

Como citar - disponível no site,
na página do artigo.

Introdução

Considerando as necessidades dos microrganismos, manuseio e armazenamento nos laboratórios, a manutenção de estirpes pode ocorrer em curtos períodos (dias ou meses), nos quais as culturas bacterianas podem ser mantidas a temperaturas relativamente baixas (4-10°C). Contudo, a conservação prolongada se apresenta como opção mais viável, porém, para isso, deve-se optar pelo armazenamento em temperaturas ultrabaixas como a criopreservação em freezers a -80°C, em nitrogênio líquido a -196°C ou a utilização do processo de liofilização que consiste no congelamento e desidratação das células bacterianas⁽¹⁾.

A liofilização é um dos processos mais conhecidos e empregados atualmente para a conservação de microrganismos. Para que este processo seja bem-sucedido, é necessário que os crioprotetores protejam a célula bacteriana, a fim de que, quando o líofilo for reidratado para uso, o microrganismo apresente as mesmas características fenotípicas e genotípicas que uma cultura de trabalho⁽²⁾.

Crioprotetores são substâncias adicionadas aos meios de suspensão de microrganismos que conferem uma ação protetora á células, evitando efeitos drásticos das etapas de preservação. Os crioprotetores reduzem danos durante o congelamento, descongelamento e secagem⁽²⁾.

A literatura cita o uso de diversos crioprotetores para o processo de liofilização. No entanto, poucos estudos apresentam uma comparação entre eles, e tampouco determinam uma “vida-útil” da cultura liofilizada.

Para provedores de ensaio de proficiência e produtores de material de referência é um grande desafio a estabilização de culturas liofilizadas a longo prazo, tendo em vista que microrganismos tem seu próprio ciclo de vida.

A glicose (monossacarídeo) e a trealose (dissacarídeo), são considerados alguns dos melhores crioprotetores da atualidade. Já a quitosana é um polissacarídeo que pode ser utilizado com esta ação⁽³⁾.

A *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentam grande importância para ensaios de proficiência de microbiológicos. O microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* é considerada uma levedura importante para a indústria alimentícia, amplamente utilizada na produção de pães, laticínios, cervejas, vinhos e cachaças, sendo necessárias cepas estáveis em longos períodos.

Objetivou-se com o presente estudo avaliar o desempenho dos crioprotetores de glicose, trealose e quitosana na manutenção da viabilidade de culturas de microrganismos de importância na indústria de alimentos, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Material e método

O presente estudo foi realizado no laboratório de microbiologia do SENAI em Chapecó. Para este estudo, utilizou-se cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, 2^o passagem, lote 699-75 e cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, 2^o passagem, lote 35-158. O meio de cultura base utilizado para a liofilização foi o ágar Skim Milk (Difco®). Os crioprotetores utilizados foram: glicose anidra (Vetec®), Trealose (Merk®) e quitosana de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich®).

A porcentagem ideal de crioprotetores extracelulares para cepas bacterianas e fúngicas é de aproximadamente 10%⁽⁴⁾, por isso utilizou-se essa porcentagem para todos os crioprotetores testados.

Para cada microrganismo, foram realizados quatro tratamentos, ou seja, quatro formas diferentes de preparo da cepa: T1: Meio Skim Milk sem adição de crioprotetores; T2: Meio Skim Milk com adição de 10% de glicose; T3: Meio Skim Milk com adição de 10% de trealose; e T4: meio Skim Milk com adição de 10% de quitosana.

Para a preparação dos microrganismos, adicionou-se 1 mL da cepa em fase estacionária ao meio de cultivo esterilizado – Skim Milk com e sem adição de crioprotetores – e procedeu-se a incubação. As amostras com *Saccharomyces cerevisiae* foram incubadas por 25 °C durante 5 dias. As cepas de *E. coli* foram incubadas à temperatura de 35 °C durante 24 horas.

Após a incubação, dispensou-se 2 mL de cada cultura em um frasco ampola de vidro para liofilização e, imediatamente congelou-se em ultrafreezer à temperatura de -70°C, o que caracteriza um congelamento rápido. Utilizou-se esta forma de congelamento, pois diminui a formação de cristais de gelo no interior da célula. O processo de liofilização foi realizado com o liofilizador da Thermo Electron Corporation Modelo FLR-DRYING.

As quantificações foram realizadas em cinco datas de quantificação distintas. A primeira foi realizada após a incubação do meio e antes do ultracongelamento, a segunda quantificação foi realizada após o ultracongelamento, antes de ser liofilizado, a terceira foi 24 horas após o término da liofilização, a quarta 30 dias após a liofilização e a quinta quantificação foi realizada 60 dias após a liofilização. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a terceira, quarta e quinta quantificação, os líofilos foram mantidos à temperatura ambiente protegidos da luz.

Para a quantificação de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizou-se Placas Petrifilm YM (®3M, lote 2017- 01 KD) e foi realizado método de Contagem de Bolores e Leveduras, de acordo com a metodologia AOAC Official Method 997.02. Para a quantificação de *E. coli*, utilizaram-se Placas Petrifilm EC (3M®, lote 2017-03 KC), e foi realizado método de Contagem de *E. coli*, conforme metodologia AOAC Official Method 998.08.

Além da viabilidade da utilização dos crioprotetores, foram avaliadas as características fenotípicas e bioquímicas das colônias presentes, a fim de verificar as injúrias provocadas às bactérias.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância pela ANOVA, e, quando significativas, a comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) e análise de

regressão para os diferentes momentos de quantificação ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas, utilizou-se o Software Bioestat, versão 5.3.

Resultados e discussão

O preparo e a utilização do meio de cultivo Skim Milk seguiram a orientação fornecida pelo seu fabricante, no entanto, os liófilos obtidos apresentaram-se quebradiços, com aparência opaca e cristalizada. A possível causa dessa reação é a cristalização dos açúcares presentes. Desse modo, acredita-se ser necessário a avaliação de novas formas de esterilização ou uma nova combinação do binômio tempo x temperatura.

Após liofilizada, as cepas foram armazenadas em temperatura ambiente, em local livre de umidade durante 60 dias.

Para os dois, o crescimento deu-se conforme o esperado, sem alterações nas características de crescimento. A Tabela 1 apresenta os resultados da viabilidade da *E. coli*.

Tabela 1. Desdobramento da interação data da Quantificação* x Resultado das Contagens (log10), para os quatro tratamentos, para o microrganismo *Escherichia coli*

Data da quantificação	Resultados das contagens (log10)			
	T1	T2	T3	T4
1	8,48 ^a	8,37 ^a	8,31 ^a	8,35 ^a
2	7,91 ^a	7,93 ^a	8,08 ^b	7,87 ^a
3	5,84 ^a	6,70 ^a	6,98 ^a	6,27 ^a
4	5,13 ^a	4,20 ^b	4,20 ^b	4,93 ^a
5	4,19 ^a	3,85 ^b	3,85 ^b	4,90 ^c

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas referem-se à comparação do tratamento nas linhas. ANOVA a 5% de significância

Conforme Tabela 1, pode-se observar que a adição da trealose (T3) favoreceu uma recuperação maior da *E. coli* após a etapa do ultracongelamento. Nesta etapa, o T3 diferiu significativamente dos demais tratamentos, pois obteve-se uma contagem maior de microrganismos, o que comprova a eficácia da trealose como crioprotetor.

Esse resultado comprova dados encontrados na literatura que afirmam de que crioprotetores são geralmente utilizados na intenção de prolongar a viabilidade celular após o congelamento e a liofilização, mas não para analisar a estabilização da concentração microbiana ao longo do tempo de estoque dos microrganismos liofilizados ⁽⁵⁾.

O acúmulo da trealose no interior da célula promove uma proteção da estrutura terciária das proteínas, através da formação de pontes de hidrogênio, protegendo-as da desnaturação durante o processo de dessecação. Além disso, a trealose na superfície

da célula também protege a face externa da membrana citoplasmática⁽⁶⁾.

De maneira geral, açúcares não são capazes de se difundir da membrana plasmática, pois atuam criando uma pressão osmótica que induzem 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^(6,7).

Ao realizar a avaliação dos tempos de contagem 4 e 5 (30 e 60 dias após a liofilização, respectivamente), o tratamento que conservou melhor e, portanto, permitiu uma melhor recuperação da *E. coli* foi o T4, ou seja, um polissacarídeo.

Os microrganismos que são naturalmente capazes de sobreviver à desidratação acumulam açúcares intracelularmente, principalmente dissacarídeos como a trealose e a sacarose. Essas moléculas de açúcares podem substituir moléculas de água intracelulares que hidratam proteínas e membranas, prevenindo a desnaturação de proteínas e a transição da fase liotrópica dos lipídeos das membranas⁽⁸⁾. No entanto, de acordo com os dados obtidos neste trabalho, após um longo período de armazenamento, a adição dos crioprotetores glicose e trealose não tiveram efeito benéfico na recuperação da *E. coli*, chegando inclusive a obtermos valores maiores de recuperação em T1, sem adição de crioprotetores. Mesmo com a adição dos crioprotetores, houve a perda de até 4 logs na contagem de microrganismos no intervalo entre a criopreservação e 60 dias após a liofilização, para todos os tratamentos. Esse efeito pode ser melhor observado analisando a Figura 1.

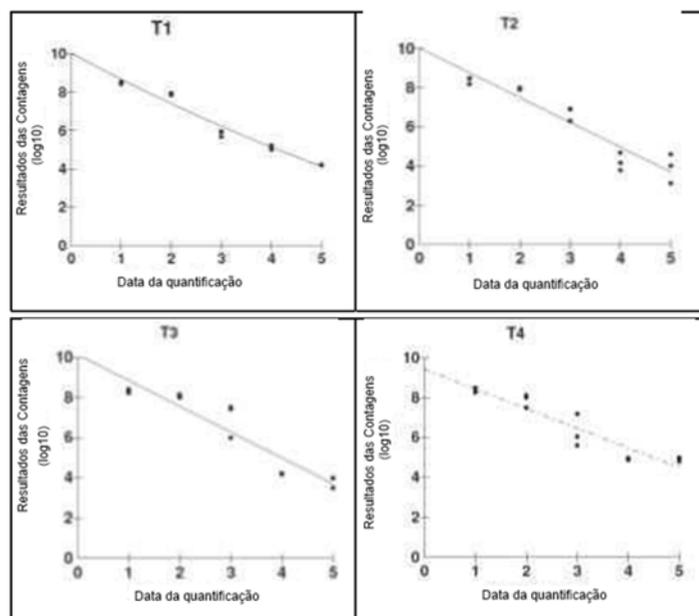


Figura 1. Evolução dos resultados das contagens em \log_{10} de *Escherichia coli* de acordo com os intervalos de quantificação (Data de quantificação).

Fonte: Dos autores

Conforme resultados das análises de regressão linear, houve relação significativa ($p < 0,05$) em todos os tratamentos, demonstrando que há um decréscimo na contagem de microrganismos (\log_{10}) conforme a evolução do tempo. No tratamento em que não houve a adição de crioprotetores (T1) foi possível observar uma queda brusca no resultado da contagem (T1) logo após a liofilização (entre os tempos 2 e 3). Nos demais tratamentos, com adição dos diferentes crioprotetores, o decréscimo foi mais homogêneo entre todas as faixas de tempo.

Em estudo semelhante realizado, houve uma perda de 9,2% da concentração de células do tratamento que utilizou Trealose em relação ao tratamento sem adição de crioprotetor.

A Tabela 2 demonstra que, nas duas primeiras quantificações (antes e depois do ultracongelamento), T1, T2 e T3 são estatisticamente iguais, com a contagem em T4 sendo um pouco maior. Após o ultracongelamento (Data de quantificação 2), T4 mantém-se pouco mais elevado, provavelmente devido à contagem inicial deste tratamento também ter sido maior.

Tabela 2. Desdobramento da interação Data da quantificação* x Resultado das contagens (\log_{10}), para os 4 tratamentos, para o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*

Resultados das contagens (\log_{10})				
Data da quantificação*	T1	T2	T3	T4
1	6,25 ^a	6,13 ^a	6,10 ^a	6,93 ^b
2	6,09 ^{ab}	6,03 ^a	6,03 ^a	6,39 ^b
3	5,93 ^a	5,88 ^a	5,75 ^b	5,75 ^b
4	5,74 ^a	4,35 ^a	5,74 ^a	5,75 ^a
5	5,97 ^a	5,66 ^a	5,76 ^a	5,28 ^a

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas referem-se à comparação do tratamento nas linhas. ANOVA a 5% de probabilidade

*Data da quantificação (período em que foi realizada a quantificação do microrganismo): 1 - Antes do ultracongelamento; 2 - Depois do ultracongelamento; 3 - 24 horas após a liofilização; 4 - 30 dias após a liofilização; e 5 - 60 dias após a liofilização

Fonte: Dos autores

Após o ultracongelamento (Data de quantificação 3), os tratamentos T3 e T4 diferem dos tratamentos T1 e T2, que possuem uma recuperação maior do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*, o que demonstra um efeito crioprotetor menor dos criopreservantes trealose e Quitosana.

Com o passar do tempo, após 30 e 60 dias de liofilização, não houve diferença estatística entre os tratamentos para o microrganismo testado.

Mesmo com a constatação de que, quando houve diferença entre os tratamentos, esta foi pequena, pode-se observar que a perda de viabilidade do *S. cerevisiae* foi menor do que da *E. coli*, sendo de apenas 2 logs. A Figura 2 evidencia a evolução da recuperação

do *S. cerevisiae* em relação aos períodos de quantificação.

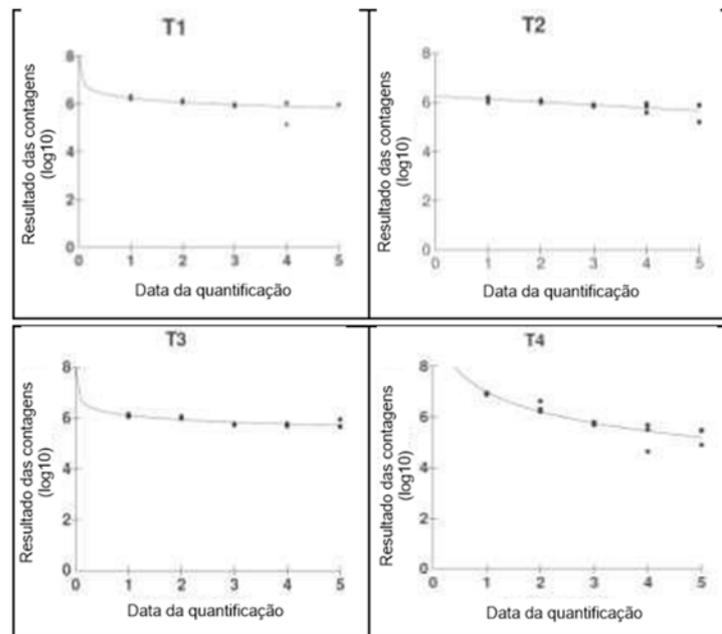


Figura 2. Evolução dos resultados das contagens em log₁₀ de *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com os intervalos de quantificação (Data de quantificação).

Fonte: Dos autores

Conforme análise estatística de regressão com ajustamento de curvas, nos três tratamentos em que houve adição de crioprotetores (T2, T3 e T4) também houve uma relação significativa entre os resultados da contagem (log₁₀) e a evolução do tempo ($p < 0,05$). No tratamento em que não houve adição de crioprotetores (T1), essa relação não foi significativa ($p > 0,05$).

As variações da resistência microbiana à dessecação estão relacionadas à fase de tratamento em que não houve adição de crioprotetores (T1). Devido à escassez de fontes de carbono e à exaustão de nutrientes na fase estacionária, diversas respostas fisiológicas são induzidas, fazendo que a célula bacteriana tente resistir a essa insuficiência de nutrientes. Tais respostas de sobrevivência acabam também protegendo a célula de outras condições adversas, como a dessecação e as baixas temperaturas⁽⁶⁾.

Estudos demonstraram que os açúcares no geral, principalmente dissacarídeos, aumentam a tolerância à dessecação em diferentes microrganismos devido à estabilização de membranas e proteínas⁽⁶⁻³³⁾.

No presente estudo, essa relação não ficou bem evidenciada, talvez pelas concentrações utilizadas, ou, também, pela escolha do agente crioprotetor.

Segundo estudo realizado comparando como crioprotetores glicerol, sacarose e gelatina na manutenção da viabilidade de Keffir, a sacarose demonstrou diferença

significativa quando comparada à amostra controle (amostra em que não havia agente crioprotetor), ou seja, a sacarose (dissacarídeos) apresentou bom desempenho como agente crioprotetor em leveduras⁽³³⁾.

Outro estudo realizado avaliando trealose como agente crioprotetor em leveduras para a produção de pães demonstrou que este dissacarídeo foi efetivo na conservação da viabilidade celular quando comparada à amostra controle⁽³⁴⁾.

No entanto, com os resultados obtidos neste estudo, não se pôde inferir o mesmo que os estudos supracitados. Para a levedura, não houve diferença significativa na manutenção da viabilidade inserindo agentes crioprotetores. Precisa-se de mais estudos aprofundados nesse sentido.

Conclusão

Nenhum dos tratamentos estudados foi efetivo na conservação da viabilidade em longo prazo, visto que houve uma diminuição de $4 \log_{10}$ /UFC/ml da primeira à última quantificação (60 dias após a liofilização), ou seja, cerca de 50% da contagem inicial foi perdida nesse período.

Para *Saccharomyces cerevisiae*, pode-se concluir que não houve ganho de viabilidade com a adição de trealose e quitosana como crioprotetores, porém esses crioprotetores demonstraram-se mais eficientes na viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* (diminuição de 2 logs) do que de *Escherichia coli* (diminuição de 4 logs).

Sugere-se que sejam testados novos agentes crioprotetores e novas concentrações a fim de aumentar a viabilidade e a proteção de cepas liofilizadas utilizadas em laboratório.

Referências

1. Costa EC, Teixeira MFS, Dantas TVM, Melo VSP, Araújo SAC, Rolim BN. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*, 2009; 19(2):111-122. Disponível em: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009.pdf. Acesso em 26 mar. 2016.
2. Moraes K, Moraes RO, Conti MJ, Lançoni MD, Castanha A, Morais K, Soares R. Manipulação, cultivo e preservação de microrganismos. Apostila de treinamento. Fundação André Tosello pesquisa e tecnologia. 2016. Impresso.
3. Wessman P, Costa JCB, Farias FM, Rosas CO, Bricio SML, Nascimento JS, Cardarrelhi-Leite P. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. *Journal of Science Food and Agriculture*, 2011; 91(14):2518-2528. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445855>. Acesso em 26 mar. 2016.
4. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, Warnken MB, Cruz MHCL, Nobrega AW. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 2013; 72(2):124-130. Disponível em <http://www.arca.fiocruz.br/xmlui/bitstream/handle/icict/8513/22274-33151-1-PB.pdf?sequence=2>. Acesso em 30 mar. 2016.
5. Morgan CA, Herman N; White PA.; Vesey G; Preservation of microorganisms by drying; a review.

Journal of Microbiological Methods, 2006; 66(1):183-193. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632005>. Acesso em 26 mar. 2016.

6. Barbas JP, Mascarenhas ERD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue bank, 2009; 10(1):49-62. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18548333>. Acesso em 26 mar. 2016.

7. Oliver AE, Hinch DK, Crowe LM. Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water contents. Compendium of Biochemical Physiology, 2002; 131(3):515-525.

8. Abreu MMV, Tutunji VL. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, 2004; 02(2):236-250. Disponível em: <http://publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/view/535/356>. Acesso em 26 mar. 2016.

9. ISO 11133:2014; Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. First edition, 2014.

10. Barnett JA. The taxonomy of genus *Saccharomyces* Meyen ex Press: a short review for non taxonomists. Yeast, 1992; 8(1):123.

11. Botrel SNFF, Fátima N, Soares F, Geraldine RM, Pereira RM, Fontes EAF. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. Ciência Tecnologia Alimentos, 2007; 27(32):32-38. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612007000100_006. Acesso em 02 fev. 2016.

12. Cameotra SS. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007; 353(4):849-850. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/6610213_Preservation_of_microorganisms_as_deposits_for_patent_application. Acesso em 26 mar. 2016.

13. Damian C, Beirão LH, Francisco A, Espírito Santo MLP, Teixeira E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. Revista Alimentos e Nutrição, Araraquara, 2005; 16(2):195-205. Disponível em: <http://servbib.fcfa.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/320/310>. Acesso em: 17 fev. 2016.

14. Doneva TU, Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms. Journal of Culture Collections, Bulgária, 2005; 4(1):17-28. Disponível em <http://www.bioline.org.br/request?cc05002>. Acesso em 17 fev. 2016.

15. Campana Filho SP, Cardoso MB, Signini R. Propriedades e Aplicações da Quitosana. Revista de Processos Químicos, Goiânia, 2007; 1(2):09-20. Disponível em: http://www.rpqsenai.org.br/images/revistas/2007/n2/propriedades_e_aplicacoes.pdf. Acesso em 19 fev. 2016.

16. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2005, 182p.

17. Halász A, Lásztity R. Use of yeast biomass in food production. CRC Press, Boca Raton, 1991, 312p. Disponível em: https://www.ufpe.br/ppgbi/images/documentos/dissertao_clarissa_s_marco2012.pdf. Acesso em 20 de março de 2016.

18. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology, 2003; 46(1):205-229. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818211>. Acesso em 26 mar. 2016.

19. Kristiansen B, Ratlidge C. Basic Biotechnology. Third Edition. Cambridge University Press, 2006, 6p.

20. Matté GM, Rosa AS. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. Revista Iberoamericana de polímeros, 2013; 14(5):206-218. Disponível em: <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/>

[SEPT13/matte.pdf](#). Acesso em 03 fev. 2016.

21. Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 1991; 35(1):109-124.

22. Prakash O, Nimonkar Y. Shouche YSS. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 2013; 339(1):1-9. Disponível em: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/339/1/1>. Acesso em 26 mar. 2016.

23. Sá CBC. Caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para aplicação na produção de bioetanol. Dissertação de mestrado em biotecnologia industrial. Recife: O Autor, 2012. Disponível em: http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/12221/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Clarissa_S%C3%A1_mar%C3%A7o2012.pdf?sequence=1&isAllowis=y Acessado em 02 fev. 2016.

24. Silva N. Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR, Okazaki MM. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos de Água. Varela: São Paulo, 2010.

25. Sola MC, Oliveira AP, Feistel JC, Rezende CSM. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, 8(14):1398-2012. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf> Acessado em 26 mar. 2016.

26. Tatangelo V, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Ambrosini R. Effect of preservation method on the assessment of bacterial community structure in soil and water samples. *FEMS Microbiology Letters*, Oxford, 2014; 356(1):32-38. Disponível em: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/356/1/32>. Acesso em 26 mar. 2016.

27. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 2006; 7(1)145-196.

28. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology*. Art Méd, 6 ed, 2002.

29. Welsh DT, Herbert RA. Osmotically induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, Oxford, 1999; 174(1):57-63. Disponível em: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/174/1/57>. Acesso em 26/03/2016.

30. Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 1971; 233(1):125-126.

31. Kumar MN. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 2000; 46: 1- 27.

32. Podlech PAS, Treml J, Ploton A, Luna MF. Avaliação de diferentes crioprotetores na conservação de *Saccharomyces boulardii* por liofilização. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 11., São Carlos, 1996. Trabalhos apresentados. São Carlos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1996; 2(1):752- 755.

33. Silva ATA, Oliveira SKM, Locatelli GO, Finkler CLL. FINKLER, C. L. L. Eficiência de Diferentes Crioprotetores, Empregados Na Liofilização, Para Preservação de Bactérias Lácticas e Leveduras em Kefir. p. 577-578. Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene. Blucher Food Science Proceedings, São Paulo, 2014; 1(1). ISSN 2359-201X, DOI [10.5151/foodsci-microal-009](https://doi.org/10.5151/foodsci-microal-009).

34. Stefanello RF. Production, Lyophilization and application of Natural Yeast in Bread type Sourdough. 2014. 162 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/5751?show=full>. Acesso em: 17 de novembro de 2019.