**COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO CANDIDA: REVISÃO**

**Maria Eduarda Lima Costa1;** Letícia de Alencar Pereira Rodrigues2; Maira Dos Santos Silva3

1 Graduanda em Engenharia Química; Iniciação Científica - Laboratório de Microbiologia; maria.costa@aln.senaicimatec.edu.br

2 Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; leticiap@fieb.org.br

3Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; maira.santos@fbter.org.br

**RESUMO**

A criopreservação é uma técnica de congelamento, que visa a prevenção do material genético de um microrganismo para realizar possíveis reativações. Essa metodologia geralmente necessita do uso de crioprotetores, para minimizar os possíveis danos que o congelamento pode ocasionar. O atual artigo busca avaliar a eficiência e viabilidade de métodos de criopreservação de fungos do gênero *Candida*, visando a conclusão da melhor técnica. A metodologia foi feita a partir da busca de artigos referente ao tema analisado e suas ratificações. Assim, com o levantamento bibliográfico foi possível concluir o método mais executável dentre os três mais utilizados.

**PALAVRAS-CHAVE:** métodos de criopreservação; candida; crioprotetores.

**1. INTRODUÇÃO**

A criopreservação é fundamental para as pesquisas laboratoriais da microbiologia, uma vez que mantém os microrganismos preservados, permitindo que haja a possibilidade de armazenar o material biológico por um longo período de tempo, até que seja necessário o uso (CARNEIRO, 2018). O método de preservação varia de acordo com o tipo de microrganismo utilizado, sendo assim não é possível padronizar um método para uso geral. Desta forma, é necessário analisar as vantagens e desvantagens de cada tipo de criopreservação para os diferentes materiais biológicos, a fim de determinar qual será melhor empregado em cada situação.

Atualmente, a técnica mais empregada é a criopreservação no ultra freezer -80°C, e por conta das baixas temperaturas é preciso utilizar crioprotetores. Os crioprotetores são substâncias que são adicionadas ao meio, para evitar que ocorra danos graves ao expor os microrganismo ao congelamento e descongelamento (CARNEIRO, 2018). A escolha da substância protetora depende de que tipos de proteção às estruturas celulares precisam, sendo elas externas, não penetrantes na célula, ou internas, penetrantes na célula (CALDAS, 2014).

A *Candida* é responsável por 80% das infecções fungicas em ambiente hospitalar, além de contribuir significante de infecções de corrente sanguínea (COLOMBO et al. 2003). Além disso, esses microrganismos tem um habitat bastante amplo, como a mucosa digestiva e a mucosa vaginal, podendo causar infecções podem nas mucosas, tecido cutâneo e até mesmo sistêmico (OLIVEIRA et al. 2015).

Com isso, o presente experimento avaliou através das metodologias, os artigos “Manutenção de leveduras por congelamento a – 20°C” por Silva et al (2008), “Atualização em métodos de conservação de fungos aplicados às coleções microbiológicas” por Gadêlha et al. (2022) e “Avaliação de metodologias de preservação para manutenção de microrganismos do Filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA” por Oliveira et al. (2015), os principais métodos de criopreservação e comparou e avaliou quatro deles, congelamento a -20°C e -80°C antecedido por 24 horas de refrigeração a 5°C com o gênero *Candida* e congelamento direto a - 70°C com o gênero *Candida.* Assim, o seguinte trabalho tem como objetivo avaliação da eficiência de métodos para criopreservação de fungos do gênero *Candida*, bem como comparação dos métodos mais utilizados na literatura.

**2. METODOLOGIA**

 A revisão da literatura foi realizado a partir de um estudo sobre diferentes métodos de criopreservação dos fungos do gênero *Candida*, de acordo com diversas fontes e datas. Assim, foram utilizados materiais do Google Acadêmico, Scielo e Mendeley. Com isso, foi feita uma planilha com os dados recolhidos, filtrando a cerca de microrganismo, método de criopreservação e crioprotetor. Por fim, foram escolhidos os 3 artigos mais relevantes, tornando a execução do atual projeto viável.

**3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

 A criopreservação é a preservação de microrganismos através de congelamento em baixas temperaturas, visando manter o DNA estável para uma possível reativação, tendo diversos métodos de serem realizados, cada um de acordo com o tipo de fungo utilizado. Por conta de se tratar de ambientes muito frios, normalmente é necessário o uso de crioprotetores, para a proteção das estruturas celulares, reduzindo os danos que o congelamento pode ocasionar, a formação de cristais de gelo intracelular, os mesmos igualmente ao método, são selecionados de acordo com a viabilidade com o material de estudo. Assim, como apresentado na tabela 1, pode conferir os microrganismos usados, os métodos e os crioprotetores.

**Tabela 1: Artigos pesquisados, métodos e resultados encontrados.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ARTIGO** | **MÉTODO** | **RESULTADOS ENCONTRADOS** |
| Manutenção de leveduras por congelamento a – 20° C | Criopreservação a -20°C antecedido por 7 dias de refrigeração, utilizando fraconetes contendo caldo infusão cérebro–coração com 20% de glicerol, incorporados com miçangas estéreis.5 | * Alto crescimento fúngico;
* Alta conservação;
* Alta recuperação;
* Fácil execução;
* Facilidade armazenamento.5
 |
| Atualização em métodos de conservação de fungos aplicados às coleções microbiológicas | Criopreservação a -20 °C antecedido por 24 horas de refrigeração a 5°C, utilizando criotubos contendo caldo glicerinado, semeados com levedura, incorporados com miçangas estéreis.1 | * Alto crescimento fúngico;
* Alta conservação;
* Alta recuperação;
* Fácil execução;
* Facilidade no armazenamento.1
 |
| Atualização em métodos de conservação de fungos aplicados às coleções microbiológicas | Criopreservação a -80 °C antecedido por 24 horas de refrigeração a 5°C e mais 24h em freezer a - 20°C, utilizando tubos de penicilina contendo ágar Sabouraud com carvão ativado e realizada a cultura fúngica.1 | * Médio crescimento fúngico;
* Media conservação;
* Media recuperação;
* Fácil execução;
* Facilidade no armazenamento.1
 |
| Avaliação de metodologias de preservação para manutenção de microrganismos do Filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA | Criopreservação direto a -70° C, utilizando microtubos de 2 ml estéreis com 0,8 ml de água destilada estéril, 0,05 ml de dimetilsulfóxido DMSO (crioprotetor), 0,1 de glicerol (crioprotetor), 10 mg de miçangas (2mm, com orifício) estéreis e 100 mg de biomassa dos isolados fúngicos.2 | * Alto crescimento fúngico;
* Alta conservação;
* Alta recuperação;
* Fácil execução;
* Facilidade no armazenamento.2
 |

**fonte: autoral**

Dessa forma, a revisão com diferentes métodos no mesmo microrganismos, permite saber qual técnica mais vantajosa para ser aplicada, de acordo com análise de viabilidade, pureza e crescimento. Isso pode ser analisado na tabela 1, que traz os resultados das quatro diferentes técnicas no mesmo microrganismo.

**4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

 Através das pesquisas realizadas é evidenteque a criopreservação é uma técnica de preservação viável para a *Candida*, uma vez que ocorreu preservação de células viáveis nos três métodos e foi possível realizar a reativação para novo uso. Como esperado pela metodologia, houve método com melhores desempenhos. Com isso, de acordo com os resultados apontados nas metodologias, é possível concluir que a criopreservação direto a -70° C se mostrou mais eficiente e viável, uma vez que obteve alto crescimento e grau de pureza, além de ter simples execução e facilidade no armazenamento.

**5. REFERÊNCIAS**

1 ALEXANDRE, V. et al. **Atualização em métodos de conservação de fungos aplicados às coleções microbiológicas**. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2022/anais/artigos/5706.pdf>.

2 OLIVEIRA, L. A.; A., C. A. C.; B., S. J. V. **Avaliação de metodologias de preservação para manutenção de microrganismos do Filo Ascomycota e leveduras do gênero Candida pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA**. Disponível em: <https://acta.inpa.gov.br/Livro-Diversidade-Microbiana-da-Amazonia/Basica\_OliveiraLA.pdf>.

3**PRESERVAÇÃO DE CULTURA DO GÊNERO ESCOVOPSIS.** Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/203958/000913524.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

4CAROLINE SANTOS DE MOURA, J. et al. **atividade antagonística de fungos endofíticos isolados de caryocar brasiliense (pequi) contra candida albicans e escherichia coli**. colloquium vitae, v. 10, n. especial 5, p. 143–149, 2018.

5 SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. **Manutenção de leveduras por congelamento a 20oC**. Rev. bras. anal. clin, p. 73–74, 2008.

6 ‌MILENE, A.; DE, F.; CARVALHO. **in vitro culture, cryopreservation and medicinal properties of byrsonima intermedia**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/4776/1/TESE\_In%20vitro%20culture%2c%20cryopreservation%20and%20medicinal%20properties%20of%20Byrsonima%20intermedia.pdf>.

7 BRITO, V.; SOUZA, D. **fundação oswaldo cruz instituto nacional de infectologia evandro chagas mestrado em pesquisa clínica em doenças infecciosas impacto de métodos de preservação na caracterização por taxonomia polifásica de isolados de sporothrix spp**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/37305/vanessa\_rabello\_ini\_mest\_2018.pdf>.