



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

POLINE DOS SANTOS SOUZA

ESTABELECIMENTO DE TÉCNICAS DE
CRIOPRESERVAÇÃO PARA MANUTENÇÃO DO BANCO DE
MICROALGAS DO INSTITUTO DE BIOLOGIA –
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Salvador

2023

POLINE DOS SANTOS SOUZA

**ESTABELECIMENTO DE TÉCNICAS DE
CRIOPRESERVAÇÃO PARA MANUTENÇÃO DO BANCO DE
MICROALGAS DO INSTITUTO DE BIOLOGIA –
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Suzana Telles da Cunha Lima
Coorientador: Dr. André Telles da Cunha Lima

Salvador

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Souza, Poline dos Santos

Estabelecimento de técnicas de criopreservação para manutenção do Banco de Microalgas do Instituto de Biologia - Universidade Federal da Bahia / Poline dos Santos Souza. -- Salvador, 2023.

65 f. : il

Orientadora: Suzana Telles da Cunha Lima.

Coorientador: André Telles da Cunha Lima.

Dissertação (Mestrado - Pós-Graduação em Biotecnologia) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2023.

1. Crioprotetores. 2. Coleções de culturas. 3. Criopreservação. 4. Microalgas. I. Lima, Suzana Telles da Cunha. II. Lima, André Telles da Cunha. III. Título.

POLINE DOS SANTOS SOUZA

Estabelecimento de técnicas de criopreservação para manutenção do Banco de Microalgas do Instituto de Biologia – Universidade Federal da Bahia

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 13 de julho de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Suzana Telles da Cunha Lima (orientadora) _____

Doutora em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas,
UNICAMP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



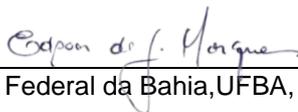
Lília Ferreira de Moura Costa _____

Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia



Edson de Jesus Marques _____

Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia, UFBA,
Brasil.
Universidade do Estado da Bahia



AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal da Bahia (UFBA) pela minha formação como Bióloga e pela minha pós-graduação, uma casa onde aprendi tanto!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da UFBA pelo suporte.

Ao Instituto de Biologia da UFBA pela infraestrutura.

Ao Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABBIOTEC) onde pude desenvolver este projeto e conviver com pessoas incríveis.

À minha orientadora Profa. Dra. Suzana Telles da Cunha Lima por todo o apoio e compreensão, um exemplo de profissional, competência e ser humano a quem tanto admiro. Meu muito obrigada pela paciência, por todos os ensinamentos e por me guiar nessa caminhada científica!

Ao meu coorientador Prof. Dr. André Telles da Cunha Lima pelo apoio na análise dos dados.

Ao professor Carlos por toda a ajuda com os experimentos, análises e conselhos, muito obrigada.

Ao LABACS e à sua coordenadora, Profa. Dra. Paula Ristow, pela gentileza em me ceder o uso do ultrafreezer.

Ao Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), na pessoa do professor José Marcos de Castro Nunes, com quem iniciei meus estudos com as algas e que deu todo o apoio deixando o laboratório de portas abertas para as inúmeras vezes que precisei.

Aos meus amigos e colegas do LAMAR que estiveram comigo em muitos dos melhores momentos: Caio, Cibele, Clara Sofia, Lorena Pedreira, Renata, Rodrigo (Guerra), Sabrina e Tiana.

Não posso deixar de fazer um agradecimento especial à Arielle e Patrícia, pela amizade, pelo exemplo nesses novos caminhos da Biotecnologia e por toda a ajuda desde a escrita do projeto até todas às vezes que estiveram à disposição para tirar minhas dúvidas.

Aos meus amigos do LAMAR Edilene e Gabriel, começamos essa jornada no mundo das algas há muito tempo e hoje cultivamos essa grande amizade que saiu dos laboratórios e foi para nossas vidas pessoais. Obrigada por estarem comigo nessa caminhada e me darem tanta força.

Aos meus amigos e colegas do LABBIOTEC: Marina e Bianca com as quais compartilhei os momentos desde a seleção até o dia a dia no lab com nossas aventuras cultivando microalgas, Fabrine por ter dividido comigo tantos momentos de incertezas, mas também as alegrias, obrigada por ter me acompanhado nos experimentos e Aaron por estar sempre disposto a ajudar e compartilhar nossas experiências na pós-graduação. À Albert (Beto), Ana Beatriz, Isadora, Jeferson, Joseane, Julia Carvalho, Júlia Santos, Maria Luiza (Malu), Mônica, Nadja, Ramon, Rebeca e Vitória por todas as alegrias compartilhadas, conversas e almoços.

Um agradecimento especial a Candé e Leonan que desenvolveram os testes pilotos de criopreservação, cujos resultados forneceram um guia para o meu trabalho. Também às minhas tutorandas Gabriela (Gabi), que além de também ter feito os experimentos piloto me auxiliou desde as etapas iniciais desse projeto, e Letícia que esteve comigo na fase final dos experimentos, obrigada por estarem sempre dispostas a me acompanhar, adorei ter compartilhado os bons momentos, experiências e aprendizados com vocês.

À minha família, em especial à minha mãe Magnólia que me deu todo o apoio necessário para que eu seguisse meu sonho e me incentivou a estudar desde que me entendo por gente.

Agradeço aos professores, colegas, amigos e todos que direta ou indiretamente colaboraram para a minha formação e que fizeram parte dessa grande experiência.

Muito obrigada!!!!

“Nada na Biologia faz sentido a não ser sob a luz da evolução.”

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes encontrados em *habitats* diversos e capazes de produzir um elevado número de compostos de interesse científico, biotecnológico e econômico. A preservação das características das microalgas em coleções de culturas é de fundamental importância para o estudo do seu potencial biotecnológico e da biodiversidade, porém, a manutenção de microalgas em meio líquido pode afetar a síntese de compostos de importância para a bioprospecção devido às mutações causadas ao longo do tempo, além dos riscos de contaminação e desgaste genômico. A fim de reduzir esses riscos a criopreservação é uma alternativa para a manutenção desse material, essa técnica é amplamente utilizada na conservação da biodiversidade microbiana que consiste na exposição desta a temperaturas criogênicas, portanto, é um recurso viável para a manutenção das espécies algais, auxiliando na preservação das características bioquímicas, com redução da taxa de crescimento e de endogamia e gerando menos desgaste do genoma. O processo de criopreservação, entretanto, pode causar danos às células denominados de crioinjúrias, desta forma o uso de agentes crioprotetores pode se fazer necessário. Esta pesquisa teve como objetivo testar e adequar protocolos de criopreservação para *Desmodesmus brasiliensis* e *Chaetoceros muelleri* da coleção do Banco de Microalgas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, bem como avaliar a eficiência e toxicidade dos agentes crioprotetores dimetilsulfóxido e metanol na criopreservação das duas espécies e calcular a taxa de crescimento de cada espécie. Entre as duas microalgas testadas no presente estudo, congeladas a -80°C por vinte dias, foi possível criopreservar *D. brasiliensis*, ainda que sem a adição de crioprotetores, sendo essa a condição que apresentou a maior taxa de crescimento. *C. muelleri* não sobreviveu à etapa do congelamento, sob nenhum dos tratamentos empregados, portanto é necessário testar novos crioprotetores e metodologias de criopreservação para a espécie. Diante dos resultados, conclui-se que é possível criopreservar microalgas mantidas em meio líquido em coleções biológicas utilizando-se uma metodologia espécie-específica, dadas suas diferentes características.

Palavras-chave: Microalgas, Criopreservação, Coleções de culturas, Crioprotetores.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms found in diverse habitats and capable of producing a high number of compounds of scientific, biotechnological and economic interest. The preservation of the characteristics of microalgae in culture collections has fundamental importance for the study of its biotechnological potential and biodiversity, however, the maintenance of microalgae in a liquid medium can affect the synthesis of compounds of importance for bioprospecting due to mutations, in addition to the risks of contamination. In order to reduce these risks, cryopreservation is an alternative for the maintenance of this material, this technique is widely used in the conservation of microbial biodiversity, which consists of exposing it to cryogenic temperatures, therefore, it is a viable resource for the maintenance of algal species, assisting in the preservation of biochemical characteristics, with a reduction in the growth rate, inbreeding and generating less damage to the genome. The cryopreservation process, however, can cause damage to cells called cryoinjuries, so the use of cryoprotectants may be necessary. This research aimed to test and adapt cryopreservation protocols for *Desmodesmus brasiliensis* and *Chaetoceros muelleri* collected from the Microalgae Bank of the Laboratory of Bioprospection and Biotechnology of the Institute of Biology of the Federal University of Bahia, as well as to evaluate the efficiency and toxicity of cryoprotectants dimethylsulfoxide and methanol in the cryopreservation of the two species and calculate the growth rate for each species. Among the two microalgae tested in the present study, frozen at -80°C for twenty days, it was possible to cryopreserve *D. brasiliensis*, even without the addition of cryoprotectants, showing the highest growth rate. *C. gracilis* did not survive the freezing stage, under any of the treatments employed, therefore it is necessary to test new cryoprotectants and cryopreservation methodologies for the species. In view of the results, it is concluded that it is possible to cryopreserve species kept in a liquid medium in biobanks using a species-specific methodology, given their different characteristics.

Keywords: Microalgae, Cryopreservation, Culture collections, Cryoprotectants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 Importância e aplicações das microalgas.....	14
2.2 Coleções de culturas	16
2.2.1 Culturas axênicas e coleções de microalgas.....	17
2.3 Criopreservação	18
2.3.1 Crioinjúrias	19
2.4 Microalgas adaptadas a ambientes frios	19
2.5 Crioprotetores.....	21
2.5.1 Metanol.....	22
2.5.2 Dimetilsulfóxido	23
2.6 Relação entre grupos taxonômicos e morfologia com a capacidade de criopreservação	23
2.6.1 <i>Chaetoceros muelleri</i> (Lemmermann)	24
2.6.2 <i>Desmodesmus brasiliensis</i> (Bohlin) E.Hegewald	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Cadastro do projeto na plataforma SISGEN e depósito no herbário ALCB.....	27
4.2 Experimentos prévios	27
4.3 Cultivo e manutenção das cepas	28
4.4 Registro do crescimento pré-criopreservação	31
4.5 Análise por varredura espectrofotométrica.....	32
4.6 Adaptação de protocolo para teste de viabilidade celular com azul de Trypan ...	32
4.7 Teste de toxicidade de dimetilsulfóxido e metanol para <i>Chaetoceros muelleri</i> e <i>Desmodesmus brasiliensis</i>	34
4.8 Criopreservação de microalgas.....	35
4.9 Descongelamento e curvas de crescimento pós-criopreservação	36
4.10 Taxas de crescimento	37

4.11 Análises estatísticas	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Experimentos prévios	38
5.2 Varredura do comprimento de onda.....	38
5.3 Crescimento pré-criopreservação	39
5.4 Adaptação de protocolo para uso de azul de Trypan	41
5.5 Teste de toxicidade de DMSO e metanol frente a <i>Chaetoceros muelleri</i> e <i>Desmodesmus brasiliensis</i> por contagem celular	43
5.6 Crescimento pós-criopreservação.....	46
5.7 Taxas de crescimento	51
6. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma técnica amplamente utilizada na conservação da biodiversidade microbiana que consiste na exposição desta a temperaturas criogênicas (AGUIAR *et al.*, 2012), se apresentando como um recurso viável para a manutenção das espécies algais. A criopreservação envolve técnicas de preservação das coleções a temperaturas baixas (-20°C a -80°C em freezer) ou ultrabaixas (-196°C em nitrogênio líquido), na qual o metabolismo dos micro-organismos permanece inativo (AGUIAR *et al.*, 2012), auxiliando na preservação das características bioquímicas, com redução da taxa de crescimento e de endogamia e gerando menos desgaste do genoma (ABREU; TUTUNJI, 2008). O processo de criopreservação, entretanto, pode causar danos às células, crioinjúrias, visto que durante o congelamento são formados cristais de gelo intracitoplasmáticos ocasionando em rupturas na membrana celular e consequente perda do material celular. Diante deste cenário, testar a viabilidade do material pós-criopreservação é fundamental para o sucesso da técnica (DAY *et al.*, 2017; KARLSSON; TONER, 1996) e dos protocolos desenvolvidos.

As microalgas são micro-organismos encontrados em *habitats* diversos, e capazes de produzir um elevado número de compostos de interesse científico, biotecnológico e econômico. A síntese de compostos como proteínas, polissacarídeos, esteróis e compostos fenólicos, que podem apresentar propriedades distintas como antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, entre outras (GARCÍA *et al.*, 2017; SATHASIVAM *et al.*, 2017) possibilita a utilização desses micro-organismos em diversos ramos, a exemplo das indústrias de alimentos e farmacêutica. Além disso, as microalgas são recursos potenciais para solução de problemas ambientais, servindo, por exemplo, como matéria-prima para produção de biocombustíveis (RIZWAN *et al.*, 2018). Por apresentarem esse potencial, o uso de tais micro-organismos é cada vez mais frequente na Biotecnologia, uma vez que os bioensaios trazem perspectivas positivas à exploração dos recursos derivados de microalgas (LIU *et al.*, 2016; OLAIZOLA, 2003; VIEGAS JUNIOR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

As diferentes características morfológicas e metabólicas de cada espécie de microalga também afetam o resultado da criopreservação, como a taxa de

crescimento, desta forma o uso de agentes crioprotetores pode se fazer necessário (MORSCHETT *et al.*, 2016). De acordo com Hubálek (2003) o emprego de crioprotetores aumenta a sobrevivência do material consideravelmente, apontando o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol e metanol entre os mais utilizados para preservação das espécies durante o congelamento.

Fernandes *et al.* (2016) observaram que os agentes crioprotetores DMSO e glicerol tiveram boa resposta para a viabilidade do congelamento de três espécies de microalgas marinhas de diferentes organizações do talo (*Desmodesmus* sp., *Chlorella sorokiniana* e *Chlamydomonas biconvexa*) em condições de baixas temperaturas (-80° C). A criopreservação de diatomáceas também tem mostrado resultados positivos em relação à recuperação pós-congelamento (STOCK *et al.*, 2018; DAY *et al.*, 2017).

A preservação das características das microalgas em coleções de culturas é de fundamental importância para o estudo do seu potencial biotecnológico e da biodiversidade (DAY, 2004), entretanto, a manutenção de microalgas em meio líquido pode afetar a síntese de compostos de importância para a bioprospecção em decorrência das mutações causadas ao longo do tempo. Além disso, os estudos taxonômicos de microalgas necessitam, muitas vezes, da existência de espécimes tipo (que são usadas como parâmetro para a identificação de outras amostras). Para tais estudos é necessário conservar suas características, sendo a criopreservação um modo de manter os aspectos morfológicos e moleculares destes micro-organismos (DAY *et al.*, 2017).

O Banco de Microalgas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABBIOTEC) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia é o primeiro no Nordeste, surgindo em 1988, com o antigo nome de Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento Ambiental (LABIOMAR), à época coordenado pelas Profas. Iracema Nascimento e Solange A. Pereira (LOURENÇO, 2006) e é, ainda hoje, um dos maiores da região Nordeste. Ele mantém uma coleção de 39 espécies de microalgas, sendo 19 marinhas e 20 dulciaquícolas. O banco também abriga, desde 2017, 39 cepas de cianobactérias que pertencem, conjuntamente, ao LABBIOTEC e ao Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR). Entretanto as microalgas e cianobactérias são mantidas *in vivo* em meio líquido, por meio de repiques constantes e troca dos meios de cultura, gerando alto custo e com manutenção laboriosa.

As 39 espécies do Banco do LABBIOTEC possuem características distintas, que afetam os resultados da criopreservação, portanto torna-se necessário testar diferentes agentes crioprotetores, bem como suas diferentes concentrações e toxicidades, a fim de estabelecer um método capaz de garantir maior taxa de recuperação das espécies após o descongelamento (TAYLOR; FLETCHER, 1998).

Diante do exposto, estabelecer técnicas mais adequadas de melhoramento da viabilidade pós-criopreservação de microalgas marinhas e dulciaquícolas da coleção do Banco de Microalgas do LABBIOTEC – UFBA poderá auxiliar na manutenção da qualidade genética dessas espécies de grande importância biotecnológica, além de aumentar a segurança em casos de perda de cepas por contaminação com outros micro-organismos e diminuir os custos para a manutenção das mesmas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Importância e aplicações das microalgas

Microalgas são micro-organismos fotossintetizantes agrupados artificialmente. Esses organismos ocorrem prioritariamente em locais com alguma fonte de umidade, por isso são abundantes em ambientes marinhos e dulciaquícolas, porém, é possível encontrá-los em ambientes terrestres nos solos e em associação mutualística com fungos formando líquens (REVIERS, 2006). Microalgas são grandes responsáveis pela produção de oxigênio, sendo, portanto, fundamentais para a manutenção da vida na Terra (LEE, 2008).

As microalgas podem, ainda, ser utilizadas para o monitoramento da qualidade da água através de ensaios ecotoxicológicos devido a sua sensibilidade a diversos contaminantes ambientais, como metais pesados. Em um estudo realizado por Falcão *et al.* (2020) três espécies do Banco de Microalgas do LABBIOTEC, *Tetraselmis chuii* e *Skeletonema costatum* (marinhas) e *Pseudokirchneriella subcapitata* (dulciaquícola), foram utilizadas na avaliação da toxicidade de bisfenol-A (BPA), amplamente empregado na fabricação de plástico e associado contaminação da biota, com ação desreguladora do sistema endócrino (KLANČIČ; GOBEC; JAKOPIN, 2022). Os resultados mostram que *T. chuii* apresenta alta sensibilidade para o BPA e que, portanto, pode ser considerada biomarcadora para BPA em ambientes marinhos. No entanto, *S. costatum* demonstrou alta resistência ao BPA e *P. subcapitata*, por sua vez, apresentou resistência e alta aglutinação celular, o que dificultou a condução do ensaio, deste modo, não são indicadas pelos autores como biomarcadoras para BPA.

Microalgas criopreservadas são também uma alternativa ao biomonitoramento e apresentam a vantagem de estar à disposição do pesquisador por maiores períodos de tempo (PAREDES; BELLAS, 2019). No estudo realizado por Benhra, Radetski e Férard (1997), *Monoraphidium capricornutum* (como *Selenastrum capricornutum*), uma microalga dulciaquícola, foi empregada a fim de detectar a presença de Cd^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+6} e do herbicida atrazina, utilizando amostras criopreservadas e não criopreservadas. As amostras criopreservadas apresentaram sensibilidade mais alta e resultados com baixos coeficientes de variação em relação àquelas não criopreservadas pelos autores.

A produção de metabólitos primários (proteínas, lipídios e carboidratos) e secundários de interesse tornam as microalgas um grupo com grande potencial para diversas áreas dentro da Biotecnologia. Sete microalgas do Banco de Microalgas do LABBIOTEC foram avaliadas para porcentagem de proteínas e conteúdo de lectina em um trabalho realizado por Carneiro, Mascarenhas e Lima (2019). Entre as espécies dulciaquícolas testadas, *Ankistrodesmus fusiformis*, *Coelastrum microporum*, e *Tetradesmus obliquus* (como *Scenedesmus obliquus*) apresentaram maior conteúdo de proteínas, enquanto que *Kirchneriella lunaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlamydocapsa bacillus* tiveram um maior conteúdo de lectina.

O cultivo de microalgas em larga escala para a produção de biocombustíveis é também uma das aplicações de uso desses organismos. O seu uso já havia se dado na crise energética do século XIX, quando estes organismos foram insumo para a produção de metanol, bem como durante a Segunda Guerra Mundial, quando Japão, Inglaterra e Israel passaram a cultivar o gênero de microalga dulciaquícola *Chlorella* com o objetivo de produzir biocombustível (GANESAN *et al.*, 2020). Como a produção de biodiesel em refinarias ainda pode ter um custo elevado, a produção estratégica de coprodutos de alto valor é uma alternativa para a redução dos custos. (RIZWAN *et al.*, 2018). Adicionalmente pode-se recorrer a outras estratégias que minimizam os custos nos “gargalos da produção” como reutilização do meio de cultivo (ANDRADE *et al.*, 2019) e novos métodos de coleta, como a eletrofloculação (RAMOS *et al.*, 2020) realizadas pelo grupo de pesquisa do LABBIOTEC.

Em um estudo publicado por (NASCIMENTO *et al.*, 2013) foi avaliada a produção de lipídios por doze cepas do Banco de Microalgas do IBio/UFBA. De acordo com os resultados, *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii* e *B. terribilis* apresentaram o maior rendimento lipídico. O estudo ainda agrupou as microalgas em três perfis de acordo com seu potencial para a produção de biodiesel, com base nesta divisão e também na relação entre a taxa de crescimento e o conteúdo de óleo. Os autores concluíram que a melhor abordagem para a geração de biodiesel a partir de microalgas seria uma mistura dos óleos produzidos por diferentes espécies.

Óleos produzidos por microalgas podem ser utilizados para alimentação humana e animal. Derivados do metabolismo primário, possuem diferentes composições tais como o tamanho da cadeia lipídica e a composição das ligações (saturadas ou insaturadas). Estes óleos conferem características necessárias à sobrevivência da microalga produtora e também são fontes lipídicas para a

alimentação humana, sendo usados, por exemplo, na suplementação de Ômega 3 e 6 (CHARLES *et al.*, 2019; MOHEIMANI *et al.*, 2018; RICCIO; LAURITANO, 2020).

Além dessas aplicações envolvendo a produção controlada de culturas axênicas de microalgas, procedimentos vêm sendo desenvolvidos para a indução de florações de fitoplâncton natural. Nesse sentido, os sistemas de aquicultura com a produção de microalgas atrelados ao tratamento de efluentes parecem ser bastante promissores. A fertilização em lagoa para aumentar a produção primária (principalmente de microalgas) tem sido praticada há séculos na piscicultura asiática. Algumas algas precisam ser processadas para que possam ser aproveitadas por peixes, camarões, larvas, etc., por exemplo. Uma das formas de processar é promover a ruptura da parede celular, dessa forma o conteúdo pode ser acessado (DE PAUW *et al.*, 1980).

2.2 Coleções de culturas

Coleções de culturas fazem parte das coleções de material biológico, também denominados bancos, são entidades que recebem, armazenam e disseminam espécimes. As coleções devem contar com condições adequadas de temperatura, iluminação e ventilação para o tipo de material mantido (PITT, 2007).

Há registro de coleções biológicas mantidas há séculos, as quais vêm fornecendo importantes informações para estudos ecológicos, como critérios de seleção de áreas para conservação, declínio de espécies, biogeografia e mudanças climáticas (PYKE; EHRLICH, 2010).

As coleções podem conter organismos vivos ou não, bem como suas partes e material genético. A riqueza de informação genética desse material biológico associada ao seu potencial biotecnológico desperta, cada vez mais, o interesse de pesquisadores e da indústria (BLATT, 2000; YEATES; ZWICK; MIKHEYEV, 2016; WALLS *et al.*, 2014).

A manutenção de materiais biológicos em coleções tem importância para atividades acadêmicas, comerciais e preservação da biodiversidade, visando que não haja perda da sua qualidade (LOURENÇO, 2006).

É recomendado que as coleções de recursos biológicos tenham um objetivo, controle de qualidade, registros da manutenção, catalogação, demanda por culturas, preparo dos procedimentos e logística. Os procedimentos para a preservação de

micro-organismos variam de acordo com as características do organismo. Há relativamente poucas pesquisas para a preservação de microalgas, entretanto, sabe-se que o armazenamento em temperaturas baixas e ultrabaixas, ou seja, a criopreservação, está entre métodos mais comuns e, nestes casos, podem ser empregados crioprotetores, sendo DMSO, metanol e glicerol os mais usados e a preservação em nitrogênio líquido a -196°C é um dos métodos que resulta em maior viabilidade (DUYGU *et al.*, 2017).

2.2.1 Culturas axênicas e coleções de microalgas

Embora não haja consenso na literatura a respeito do conceito de culturas axênicas e para alguns autores a existência de tais culturas não seja possível, o primeiro passo para um cultivo com grau de pureza aceitável ou seja, uma monocultura algal é reproduzir as condições do ambiente da espécie desejada, depois eliminar os contaminantes e, por fim, manter o cultivo continuamente. Após o isolamento é preciso avaliar possíveis danos que a microalga tenha sofrido (MINHAS *et al.*, 2016; SCHUELTER *et al.*, 2019).

O aumento da busca por produtos metabolizados por microalgas implica em uma necessidade cada vez maior por cultivos unialgais, a fim de garantir que os cultivos produzam os compostos gerados pela microalga de interesse, uma das formas de assegurar quais metabólitos estão sendo produzidos é através de sequenciamento genético (WU *et al.*, 2015). Neste caso, a criopreservação é uma alternativa aos repiques a fim de preservar a carga genética das microalgas mantidas em bancos (VU *et al.*, 2018).

A presença de bactérias simbiotes nas culturas de microalgas pode ser benéfica para o crescimento de algumas espécies, principalmente para aquelas que não sintetizam vitaminas, porém microalgas criopreservadas juntamente com organismos parceiros tiveram decréscimo na viabilidade pós-criopreservação, portanto, indicando que culturas axênicas de microalgas não dependentes de bactérias são mais indicadas para a criopreservação (AMARAL *et al.*, 2013).

2.3 Criopreservação

A criopreservação é um conjunto de técnicas que visa o congelamento de material biológico abaixo de 0°C sem que as atividades biológicas sejam prejudicadas pela baixa temperatura (WOLKERS; OLDENHOF, 2015). Os primeiros conceitos sobre criopreservação surgiram por volta do século XIX (FULLER, 2004).

De acordo com Day (2004) a criopreservação é uma das abordagens que podem ser empregadas na preservação até longo prazo com o objetivo de reduzir ou evitar diversas limitações decorrentes da manutenção através da transferência seriada ou repiques. Os protocolos podem ser simples ou envolver técnicas mais elaboradas e variam de acordo com o material a ser criopreservado, resultados desejados (como tempo de preservação) e recursos disponíveis. Um dos principais desafios da criopreservação é possibilitar que a água presente nos meios interno e externo à célula esfrie abaixo de seu ponto de fusão antes que ocorra a nucleação do gelo e, conseqüentemente, a formação de cristais de gelo.

A partir da década de 1970 foram desenvolvidas técnicas de criopreservação de microalgas marinhas e dulciaquícolas (CAÑAVATE; LUBIAN, 1995). A criopreservação se mostra como um processo viável para a manutenção de espécies microalgais a curto prazo e a longo prazo sendo aplicadas temperaturas de -80°C ou -196° (GARRIDO-CARDENAS *et al.*, 2019; KAPOORE *et al.*, 2019)

Diversos fatores podem influenciar a viabilidade das microalgas após o congelamento. Piaseck *et al.* (2009), observaram que *Chlamydomonas reinhardtii* criopreservada em alta concentração celular resultou em baixa viabilidade, pois durante o congelamento são liberadas substâncias nocivas.

Segundo Müller *et al.* (2007) a adição de determinados crioprotetores, assim como eventuais crioinjúrias mediadas por radicais livres (o que pode prejudicar a ação de enzimas) causadas no processo de congelamento e descongelamento, podem ocasionar alterações genéticas no material criopreservado. Empregando a técnica de impressão digital (AFLP) em 28 cepas de microalgas terrestres os autores concluíram que em metade das cepas testadas houve alterações genéticas quando aplicada uma técnica de congelamento em dois passos, foram utilizados dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol como crioprotetores para algumas das cepas. Os autores também consideram que o processo de criopreservação pode selecionar subpopulações geneticamente diferentes.

2.3.1 Crioinjúrias

O congelamento de organismos vivos em provoca lesões celulares devido a perfurações causadas pela formação de cristais de gelo nos meios intra e extracelular, destruindo-as por ação mecânica direta (WOLKERS; OLDENHOF, 2015).

A água presente nos meios intra e extracelular do material criopreservado sofre alterações biofísicas e há formação de cristais de gelo. Geralmente a formação de tais cristais se inicia no meio extracelular, o que causa um estresse osmótico pela maior concentração de soluto no meio externo e consequente perda de água pela célula, levando à desidratação, em seguida os cristais de gelo se propagam para o meio intracelular, conseqüentemente há ruptura da membrana celular e danos às organelas (FULLER, 2004).

2.4 Microalgas adaptadas a ambientes frios

Uma diversidade de organismos é capaz de sobreviver em ambientes com temperaturas iguais ou inferiores a 0°C. Micro-organismos como bactérias, fungos e microalgas também exibem essa capacidade e são chamados de psicrófilos ou psicotróficos. Esses organismos desenvolveram estratégias adaptativas a fim de reduzir os efeitos negativos causados por essas condições severas e permitir sua sobrevivência (HAMDAN, 2018). Tais estratégias envolvem adaptação do maquinário enzimático, síntese de proteínas de choque frio, proteínas anticongelantes, proteínas de nucleação de gelo, adaptação do conteúdo de ácidos graxos, entre outros mecanismos metabólicos e estruturais (MARGESIN; FELLER, 2010)

As microalgas encontradas em *habitats* com temperatura extremamente baixa, precisam lidar ainda com outros fatores que também podem estar presentes, como variação extrema da intensidade luminosa, congelamento e descongelamento, baixa disponibilidade de água, quantidade reduzida de nutrientes e estresse osmótico e oxidativo. A composição lipídica da membrana se adapta para acompanhar as condições de temperatura, ou seja, a saturação e o comprimento das cadeias lipídicas muda, o que afeta a fluidez da membrana e a permeabilidade, assim em baixas

temperaturas há tendência ao aumento do conteúdo de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados (LAURITANO *et al.*, 2020).

De acordo com Purshkareva *et al.* (2016) ainda há pouco conhecimento a respeito dos solos de regiões polares, as espécies de microalgas presentes nessas regiões sofrem com condições sazonais extremas, incluindo temperaturas que podem estar abaixo de -34°C e isto afeta a diversidade. Os autores consideram ainda que os estudos acerca da morfologia de microalgas de solo ártico demonstram que as condições de estresse podem induzir, por exemplo, a um estado de dormência ou à presença de vacúolos (ausentes em muitas microalgas) em microalgas polares marinhas para o controle do fluxo de água.

Pichrtová *et al.* (2014) observaram que em *Zygnema* sp., encontrada no Ártico, algumas das estratégias para superar a dissecação são presença de acinetos para armazenamento de produtos e alteração da morfologia dos cloroplastos.

Entre as proteínas envolvidas nos processos adaptativos ao frio as proteínas anticongelamento se ligam ao gelo e inibem seu crescimento e recristalização. Acredita-se que elas se liguem irreversivelmente a cristais de gelo com planos espaciais específicos impedindo uma segunda nucleação (ESKANDARI *et al.*, 2020). O uso de tais proteínas é uma alternativa biotecnológica para o aumento da viabilidade na criopreservação de materiais biológicos e melhor qualidade de alimentos congelados (DING *et al.*, 2014).

Proteínas de nucleação de gelo são proteínas grandes ligadas à membrana celular que facilitam a formação de gelo e atuam na organização e estabilização das moléculas de água e, assim como, as proteínas anticongelamento também possuem potencial para aplicações biotecnológicas (XIANG *et al.*, 2020).

Enzimas produzidas por microalgas adaptadas ao frio, como superóxido dismutase e as proteínas de choque térmico 97 e 70 (Hsp 97 e Hsp 70, respectivamente), expressam alta atividade permitindo a manutenção das taxas metabólicas (XING *et al.*, 2022). Desse modo, microalgas psicrófilas regulam as vias metabólicas e sua morfologia às condições extremas aumentando suas taxas de sobrevivência (COLLINS; MARGESIN, 2019).

(Kobiyama *et al.* (2010) observaram o aumento da proteína de choque térmico Hsp70, quando duas cepas da microalga dinoflagelada *Alexandrium tamarense*, provenientes do Japão e da Malásia, originalmente cultivadas a 15°C e 25°C, respectivamente, foram submetidas a tratamento com temperaturas entre 0 e 37°C.

Nesse estudo, os autores concluíram que após um período de aclimação, as taxas de sobrevivência a baixas temperaturas aumentaram.

2.5 Crioprotetores

Crioprotetores são substâncias que quando adicionadas a um material a ser criopreservado pode aumentar a viabilidade após o descongelamento. Embora possam modular os danos sofridos pela exposição às baixas temperaturas eles também podem apresentar toxicidade à célula a depender da sua concentração, do tempo de exposição e da temperatura utilizada no congelamento (FULLER, 2004).

Os crioprotetores são classificados de acordo com sua capacidade de atravessar ou não a membrana celular. Crioprotetores capazes de atravessar a membrana são chamados de penetrantes, possuem baixo peso molecular e atuam nos meios intra e extracelular, em contraste, os que não atravessam a membrana são denominados de não penetrantes, têm alto peso molecular e sua ação é restrita ao meio externo às células. As moléculas de açúcares como glicose e sacarose agem na bicamada lipídica durante o congelamento, são classificadas como crioprotetores não penetrantes (TSAI *et al.*, 2018)

Crioprotetores permeáveis, como dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol, são compostos de baixo peso molecular capazes de permear a membrana celular e contribuir na redução de mudanças no volume celular durante o congelamento. Eles podem se ligar à água reduzindo a quantidade de moléculas de água disponíveis para formação de gelo, sendo capazes de reduzir o estresse hipertônico (CAÑAVATE; LUBIAN, 1995).

O uso de crioprotetores, em geral, o aumenta as taxas de recuperação após a criopreservação como foi demonstrado com *Chlorella minutíssima*, criopreservada com DMSO em uma temperatura de -80°C. O estudo indica, no entanto, que para a espécie *Dunaliella tertiolecta* o congelamento sem DMSO teve melhor viabilidade, segundo Tzovenis *et al.* (2004). Em uma outra abordagem, feita por Kugler *et al.* (2020) os resultados indicaram que a sobrevivência de *Lobosphaera incisa* ao congelamento durante 1 mês a -20 ° C e -80 ° C, foi maior sem agentes crioprotetores.

Ha *et al.* (2019) analisaram os efeitos de diferentes crioprotetores (DMSO, glicerol, metanol, prolina, etileno glicol, glicose e sacarose). Os autores obtiveram viabilidade acima de 88% na criopreservação de *Ettlia* sp., uma clorofícea

dulciaquícola, com diferentes combinações de DMSO e metanol. *Ettlia* sp. foi mantida por 1 ano a -80°C , de acordo com um método otimizado de combinação de crioprotetores e aclimação a 4°C por 24 horas. Foi notado o aumento da expressão das proteínas de choque térmico Hsp70, Hsp90 e proteínas quinases dependentes de Ca^{+2} (CDPK), ambas proteínas envolvidas na resposta ao estresse por frio. Também houve aumento do conteúdo de ácidos graxos insaturados, o que permitiu maior fluidez da membrana.

Silkina *et al.* (2017) relataram que não houve diferença entre a capacidade de biorremediação de um efluente entre um consórcio de microalgas criopreservadas com DMSO 5% em nitrogênio líquido por 3 meses e do controle não criopreservado.

A fim de avaliar o efeito de crioprotetores na atividade fotossintetizante e o conteúdo de clorofila em *Haematococcus pluvialis*, Chekanov *et al.* (2018) criopreservaram a microalga por um mês a -80°C com DMSO 2% e glicerol 5%. Após sete dias de descongelamento não houve sobrevivência das amostras congeladas sem adição dos crioprotetores, entretanto, para aquelas amostras com adição de crioprotetores a viabilidade variou de 40 a 60%. O conteúdo de clorofila nas células tratadas com crioprotetores e a atividade fotossintetizante se aproximaram do valor inicial após sete dias de recuperação, naquelas sem crioprotetores houve redução dessas duas variáveis. Os autores atribuem a queda do conteúdo de clorofila à degradação do pigmento e à morte celular; também foi observada, através de análises de micrografias eletrônicas formação de cristais de gelo nas células sem crioprotetores.

2.5.1 Metanol

Metanol (CH_3OH) caracteriza-se por ser um solvente polar (ZHOU *et al.*, 2020) que penetra nas células em maior velocidade que a água e aumenta a permeabilidade da membrana celular, um dos seus efeitos como crioprotetor se dá pela sua capacidade de remodelar os lipídios da membrana celular (YANG e LI, 2016).

Em estudo realizado por Okumura *et al.* (2001) o metanol se apresentou como um solvente tóxico intermediário, porém apresentou menor toxicidade para *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis tetrathele*, *Isochrysis galbana* e *Pavlova lutheri*. Outro aspecto

importante é que, segundo Zheng *et al.* (2018), o tamanho celular tem influência sobre o efeito crioprotetor do metanol.

2.5.2 Dimetilsulfóxido

Dimetilsulfóxido é um solvente polar de fórmula $(CH_3)_2SO$ (CHEN *et al.*, 2021) que auxilia proteínas gelo-ligantes na redução da recristalização do gelo, um dos fatores que mais influenciam na morte celular, desse modo, o DMSO pode apresentar efeito positivo na criopreservação de microalgas. (KIM *et al.*, 2017; ARAY-ANDRADE *et al.*, 2018).

Estudos realizados por Fernandes *et al.* (2019) demonstram que o dimetilsulfóxido (DMSO) foi responsável pela maior viabilidade celular pós-criopreservação para a grande maioria das microalgas clorófitas cocoides (de morfologia esférica) (LEE, 2008).

2.6 Relação entre grupos taxonômicos e morfologia com a capacidade de criopreservação

A morfologia e características fenotípicas das microalgas indicam estarem mais ligadas com sua criosensibilidade do que com suas relações taxonômicas, conforme Boroda *et al.* (2014). Entretanto, em outro trabalho, realizado por Tessarolli *et al.* (2017) verificou-se uma relação entre o sucesso da recuperação e a posição taxonômica. Mesmo assim a autora pontua uma maior taxa de recuperação para microalgas menores do que para as maiores e mais complexas.

As microalgas utilizadas no presente trabalho foram *Chaetoceros muelleri* e *Desmodesmus brasiliensis*.

2.6.1 *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann)

Classificação taxonômica de acordo com Guiry e Guiry (2020):

Reino Chromista

Filo Bacillariophyta

Subfilo Bacillariophytina

Classe Mediophyceae

Subclasse Chaetocerotophycidae

Ordem Chaetocerotales

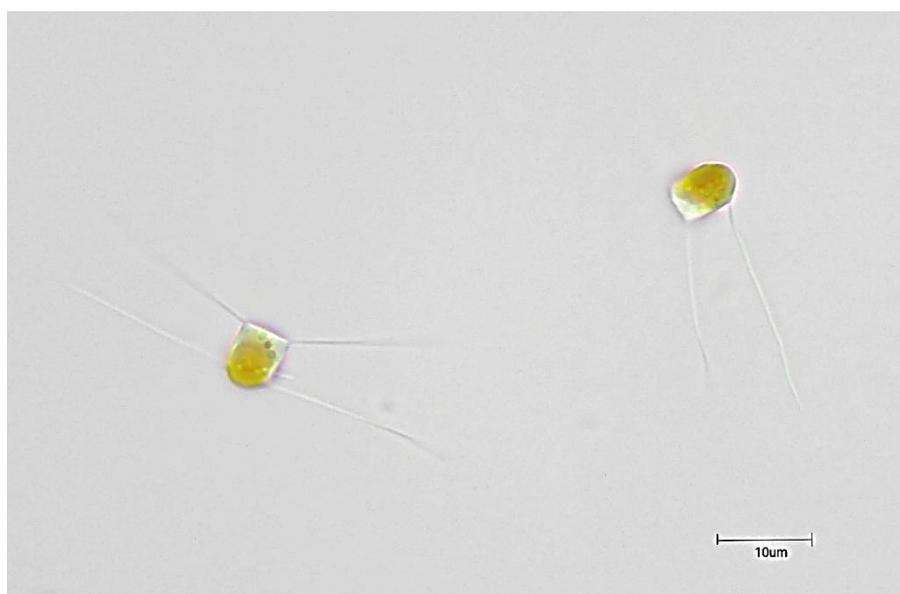
Família Chaetocerotaceae

Gênero *Chaetoceros*

Descrição: Células formando colônias filamentosas, com valvas vizinhas ligadas por uma seta torcida que se estende do polo de cada valva. Valvas e cerdas são levemente silicificadas. As valvas são elípticas. Frústulas dissociadas resultam em valvas vizinhas permanecendo conectadas face a face à valva. A face da valva das células intercalares é levemente convexa. A face da valva não possui ornamentação distinta (BURGE, 2017, LEMMERMANN, 1898), (Figura 1).

Chaetoceros muelleri é uma diatomácea marinha, capaz de se adaptar a diferentes salinidades (BLINN, 1984; BARROS *et al.*, 2014).

Figura 1 - *Chaetoceros muelleri* em microscópio óptico em aumento de 100x.



Fonte: Elaborado pela autora

2.6.2 *Desmodesmus brasiliensis* (Bohlin) E.Hegewald

Classificação taxonômica de acordo com Guiry e Guiry (2020):

Reino Plantae
Subreino Viridiplantae
Infrareino Chlorophyta
Filo Chlorophyta
Subfilo Chlorophytina
Classe Chlorophyceae
Ordem Sphaeropleales
Família Scenedesmaceae
Subfamília Desmodesmoideae
Gênero *Desmodesmus*

Descrição: Cenóbios com quatro células alinhadas linearmente. Células elípticas, pólos arredondados. Parede celular com costelas longitudinais às vezes descontínuas. Cloroplasto único, parietal com pirenóide (MENDES *et al.*, 2012), (Figura 2).

Desmodesmus brasiliensis ocorre em ambientes dulciaquícolas, com ampla ocorrência (HULAI *et al.*, 2021; DA SILVA e FONSECA, 2018; REDDY; CHATURVEDI, 2015)

Figura 2 - *Desmodesmus brasiliensis* em microscópio óptico em aumento de 100x



Fonte: Elaborado pela autora

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Testar e adequar protocolos de criopreservação para duas espécies de microalgas, uma marinha e uma dulciaquícola da coleção do Banco de Microalgas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABBIOTEC) do Instituto de Biologia da UFBA.

3.2 Objetivos específicos

- Testar condições de criopreservação para as microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Desmodesmus brasiliensis*.
- Avaliar a eficiência e toxicidade dos agentes crioprotetores DMSO e metanol na criopreservação das cepas em estudo.
- Calcular a taxa de crescimento de cada espécie
- Indicar a melhor solução crioprotetora para cada espécie testada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cadastro do projeto na plataforma SISGEN e depósito no herbário ALCB

O presente projeto foi cadastrado na plataforma eletrônica do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional (SISGEN) sob o número A653955. Este trabalho faz parte do projeto: Coleção de Microalgas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABBIOTEC) do Instituto de Biologia, cujo número de credenciamento é C945879.

As cepas do Banco de Microalgas do Instituto de Biologia da UFBA foram cadastradas na plataforma Botanical Research And Herbarium Management System (BRAHMS) e depositadas no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) do IBio/UFBA.

Os números de depósito das espécies trabalhadas neste estudo são ALCB137424 (*Chaetoceros muellerii*) e ALCB137414 (*Desmodesmus brasiliensis*).

As cepas foram também fotografadas em microscópio óptico binocular (Olympus TM -CX 31) com câmera acoplada (Prime Cam Intervision).

4.2 Experimentos prévios

Foi elaborado um experimento piloto com dez microalgas marinhas (*Chaetoceros gracilis*, *Diacronema lutheri*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis* aff. *galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Pyramimonas virginica*, *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica*, *T. chuii*) e dez espécies dulciaquícolas (*Ankistrodesmus fusiformis*, *A. falcatus*, *Botryococcus braunii*, *Chlamydocapsa bacillus*, *Chlorella vulgaris*, *Coelastrum indicum*, *Coelastrum microporum*, *Kirchneriella lunaris*, *Raphidocelis subcapitata* e *Tetradesmus obliquus*).

Foi testada a influência de diferentes variáveis na criopreservação destas espécies. As variáveis testadas foram: temperatura de congelamento, fase de crescimento em que foram coletadas e crioprotetores. As microalgas foram coletadas em três diferentes fases de crescimento: início da fase exponencial (3º dia), final da fase exponencial (6º dia) e fase estacionária (9º dia). Os crioprotetores utilizados foram DMSO e glicerol (ambos à 10% v/v), para as espécies dulciaquícolas também foi testada a concentração de DMSO 5%. Neste teste as microalgas foram

aconditionadas em criotubos de polipropileno com DMSO, glicerol e controle (sem crioprotetor), congeladas por 15 dias e submetidas às temperaturas de -20°C e -80°C . Após esse período as microalgas foram descongeladas em banho-maria até temperatura ambiente e centrifugadas. O precipitado foi ressuspenso em meio Conway para marinhas e meio Oligo para dulciaquícolas.

Foram elaboradas curvas de crescimento pós-criopreservação por meio leitura de absorbância, sob comprimento de luz de 680nm. Essas curvas foram comparadas àquelas feitas anteriormente (pré-criopreservação).

4.3 Cultivo e manutenção das cepas

As duas microalgas trabalhadas foram retiradas do Banco de Microalgas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia no Instituto de Biologia da UFBA, de acordo com as instruções do Manual de Cultivo de Microalgas (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Foram retirados 3,0 mL de cada cepa e pré-inoculadas em 200 mL de meio de cultivo correspondente em Erlenmeyer fechado com capuchão de algodão e gaze e mantidos sob aeração por bomba com auxílio de mangueira de borracha inserida no capuchão. *Chaetoceros muelleri* foi cultivada em meio de cultura Conway (WALNE, 1966 *apud* LOURENÇO, 2006) com adição de silicato a $3,3\ \mu\text{m}$ (Tabelas 1 e 2), enquanto que a *Desmodesmus brasiliensis* foi cultivada em meio L. C. Oligo (CETESB, 1992) (Tabelas 3 e 4). A iluminação ocorreu através de lâmpadas fluorescentes de 32 W (Philips®), irradiância de $\pm 114\ \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, temperatura de $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$, pH 7,0 a 7,2 e fotoperíodo de 12 horas, controlado por temporizador (B-MAX YDT-MB).

Tabela 1 - Soluções do meio de cultivo Conway

Solução	Reagente	Massa (g)
Principal (P)	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	45
	H_3BO_3	33,6
	NaNO_3	100
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,36
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,30
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20,0
Traços de metais	ZnCl_2	0,21
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20

	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,09
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,20
Vitaminas	Vitamina B12	5,0 mg
	Vitamina B1	100 mg
Silicato de Sódio (S)	$\text{Na}_2\text{OSiO}_{2,n}\text{H}_2\text{O}$	4,0

Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2009

Tabela 2 - Meio de cultivo Conway

Cultura	Componente	Volume (mL)
Diatomáceas	Água do mar	1000
	Solução P	2,0
	Solução S	2,0
	Vitaminas	0,1

Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2009

Tabela 3 - Soluções do meio de cultivo LC Oligo

Solução	Reagente	Massa (g)
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,0/100MI
2	KNO_3	10/100MI
3	MgSO_4	1,466/100 MI
4	K_2HPO_4	4,0/100 mL
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,06
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06
	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,06
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,06
	H_3BO_3	0,06/1000 MI
	6	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,313
$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$		0,594/500 mL
7	NaHCO_3	15,0/1000 mL

Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2009

Tabela 4 - Meio de cultivo LC Oligo

Componente	Volume (mL)
Água destilada	1000
Solução 1	1,0
Solução 2	1,0
Solução 3	1,0
Solução 4	1,0
Solução 5	0,5
Solução 6	0,5
Solução 7	2,0

Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2009

Os repiques de *C. muelleri* ocorreram a cada 15 dias e de *D. brasiliensis* a cada 20 dias, no início das suas respectivas fases estacionárias, aumentando-se o volume do cultivo progressivamente. Primeiramente foram adicionados 50 mL do inóculo em 500 mL de meio, posteriormente, para o aumento do volume do cultivo, foram adicionados 100 mL de inóculo para 1L de meio (Figura 3). Após esse período os cultivos foram mantidos em volume de 1L sob as mesmas condições.

Figura 3 - Cultivo de *Desmodesmus brasiliensis* (à esquerda) e *Chaetoceros muelleri* (à direita)



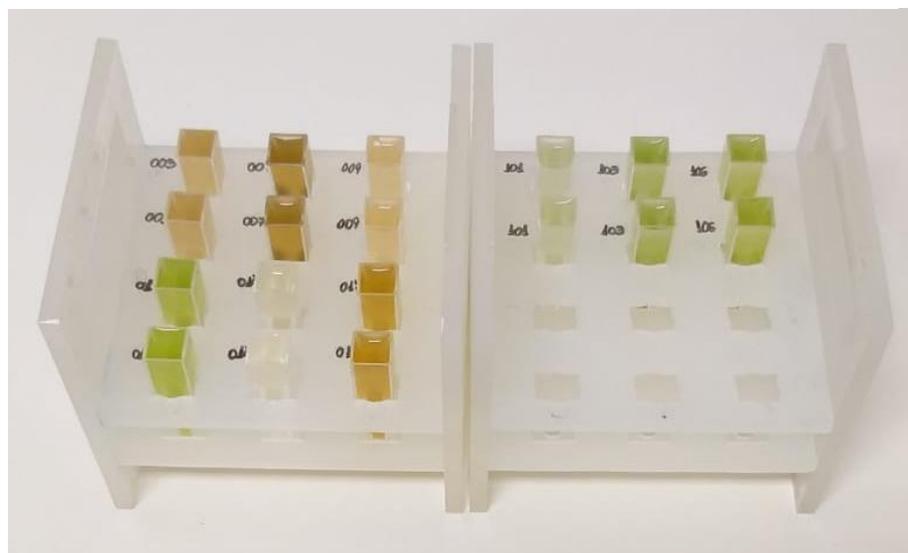
O pH dos meios foi ajustado para $7,1 \pm 0,1$, e autoclavado por 20 minutos a 121°C .

4.4 Registro do crescimento pré-criopreservação

O acompanhamento do crescimento das microalgas cultivadas *in vivo* foi realizado através da determinação da densidade óptica (D.O.) e da contagem direta do número de células com câmara de Neubauer.

Para a leitura da densidade óptica foram retirados, com pipeta graduada, 3,0 mL de amostra após agitação manual do Erlenmeyer para homogeneização, repetindo o procedimento para cada espécie, as leituras foram feitas em triplicata e ocorreram a cada dois dias. (Figura 4). O comprimento de onda utilizado para a leitura foi de 680 nm, por meio de espectrofotômetro (Helios ϵ UNICAM).

Figura 4 - Amostras em cubeta para leitura de absorbância



A contagem celular foi feita utilizando a câmara de Neubauer, para isso foi retirada uma alíquota e realizada a diluição gradual para a redução da concentração, em seguida as células foram contadas com auxílio do microscópio óptico binocular Olympus CBA, de acordo com a metodologia registrada em Lourenço (2006). A fim de obter o número de células por volume (concentração) foi feito o cálculo com base na equação a seguir (NASCIMENTO *et al.*, 2009):

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Após leitura e contagem foram elaboradas curvas de crescimento para cada espécie a fim de observar as taxas e as fases de crescimento e, conseqüentemente, o melhor dia para coleta das amostras para a criopreservação.

As curvas padrão de crescimento foram elaboradas através do *software* GraphPad Prism versão 6.

4.5 Análise por varredura espectrofotométrica

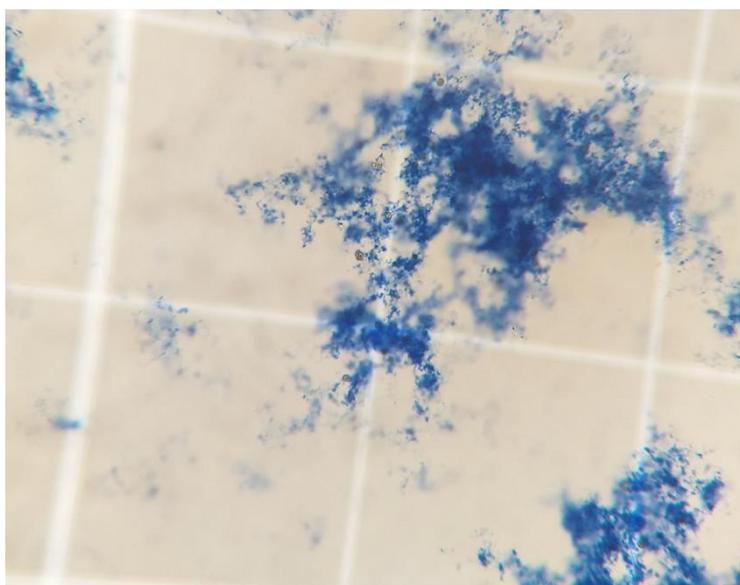
A fim de verificar o comprimento de onda ideal para a leitura de absorbância que estava sendo utilizada, foi realizada uma varredura através de espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS) com auxílio do *software* UV WinLab Run nos comprimentos de onda de 200 a 700nm. O teste foi feito com *C. muelleri*, coletada na fase exponencial e as amostras dispostas em cubeta para a leitura.

4.6 Adaptação de protocolo para teste de viabilidade celular com azul de Trypan

Para testar a viabilidade celular das microalgas nos testes de toxicidade com DMSO e metanol por exclusão com azul de Trypan, foi testado um protocolo (THIRUVARASN *et al.*, 2015) a fim de estabelecer a concentração ótima de corante para determinação do número de células mortas na amostra. Porém o teste não demonstrou ser eficiente para o uso em questão uma vez que não foi possível corar muito bem as células a ponto de distinguir viáveis de inviáveis.

O protocolo se fez necessário tendo em vista a formação de agregados celulares com o corante, o que ocorreu em todas as diluições corante/meio testadas (variando de 1:19 a 1:1) e nos diferentes tempos de exposição (2, 3, 5, 10, 15 e 30 minutos), impossibilitando a contagem (Figura 5).

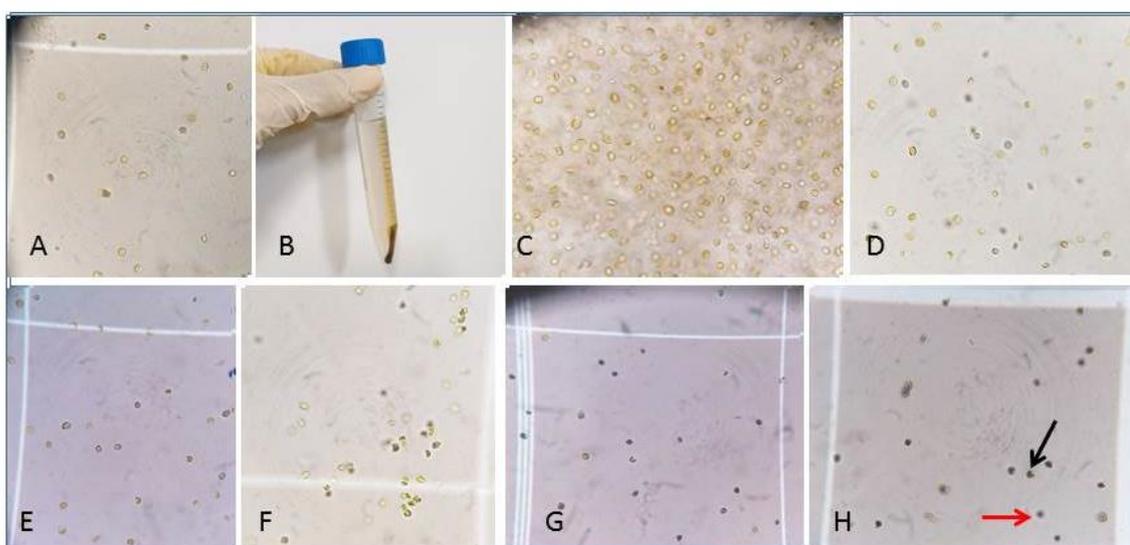
Figura 5 - Agregado de azul de Trypan com *Chaetoceros muelleri* em câmara de Neubauer



A determinação do protocolo foi feita com a microalga marinha *Chaetoceros muelleri* e teve início com a observação das microalgas do cultivo em microscópio óptico binocular (Olympus CBA) a fim de certificar que a morfologia da mesma estava inalterada (Figura 6A). À mesma amostra foi adicionado o corante azul de Trypan 0,4% (gibco by Life Technologies), já ocorrendo formação dos agregados. Em seguida um volume de 5,0 mL do cultivo foi centrifugado (IEC HN-S Centrifuge) em tubo Falcon por 4 minutos, com uma velocidade de 2.500 rpm com o objetivo de obter um material livre do meio de cultivo para testar se este interferia na ação do corante (Figura 6B). O sobrenadante foi descartado e uma amostra das microalgas foi observada em microscópio óptico não apresentando quaisquer alterações morfológicas; esta etapa foi feita com o objetivo de avaliar se a centrifugação causaria danos mecânicos às células (Figura 6C). A ressuspensão foi feita por meio de solução salina com 5,0 mL de água destilada e NaCl 28‰, nessa etapa também não houve alteração na morfologia celular. Foram adicionados azul de Trypan à amostra, na proporção de 1:1

e realizada nova observação ao microscópio na qual também não foram verificadas alterações morfológicas significativas, porém foi possível observar uma coloração azulada em poucas células (Figuras 6D e 6E). A fim de obter um material contendo células vivas e mortas para testar a aplicabilidade do azul de Trypan com *C. muelleri* foi realizado um tratamento com calor em uma alíquota a fim de induzir a morte da mesma. Uma alíquota foi então exposta ao calor próximo à chama por 1 minuto e observado em lâmina, verificando-se danos em todas as células (Figura 6F), esta alíquota foi corada (Figura 6G), o que corroborou que o tratamento com calor tornou as células inviáveis. O material tratado com calor foi adicionado, na mesma proporção, com aquele sem exposição ao calor (portanto vivas) e corado a fim de distinguir as células vivas das mortas e/ou danificadas (Figura 6H).

Figura 6 - Protocolo para uso de azul de Trypan para *Chaetoceros muelleri*



A. Cultivo sem tratamento. B. Centrifugado. C. Após centrifugação. D. Ressuspensão em solução salina. E. Ressuspensão com azul de Trypan. F. Após aquecimento. G. Após aquecimento com azul de Trypan. H. Mistura de células vivas e mortas e/ou danificadas por calor com azul de Trypan - sem aquecimento (seta vermelha) e após aquecimento (seta preta).

4.7 Teste de toxicidade de dimetilsulfóxido e metanol para *Chaetoceros muelleri* e *Desmodesmus brasiliensis*

A toxicidade dos agentes crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol foi testada com o objetivo de determinar a concentração inibitória para 50% (IC50) da população de microalgas através da curva de dose-resposta.

Os ensaios de toxicidade foram feitos pela exposição das espécies *Chaetoceros muelleri* e *Desmodesmus brasiliensis* a concentrações crescentes de DMSO (Synth) e metanol (Synth). *C. muelleri* e *D. brasiliensis* foram coletadas no início da fase estacionária (15° dia e 20° dia de crescimento, respectivamente).

As concentrações foram de 0% (controle), 2%, 4%, 6%, 8% e 10% do solvente com volume final de 10 mL. Os tubos de ensaio foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e iluminação do cultivo por 72 horas. Os tubos foram agitados manualmente até homogeneização nos três dias do experimento.

Após o tempo de exposição foi feita a contagem das células a fim de obter o número de células/mL. A contagem ocorreu em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico binocular (Olympus CBA), acompanhada da leitura de absorbância em espectrofotômetro (Helios ε UNICAM) no comprimento de onda de 680 nm.

Para a plotagem dos gráficos e cálculo do IC50 foi utilizada a opção de regressão não linear do *software* GrahPad Prism versão 6, utilizando-se a equação abaixo:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom})/(1+10^{((\text{LogIC50}-X)*\text{HillSlope})})$$

Onde:

Y = número de céls/mL

X = concentração do crioprotetor

Bottom = concentração da resposta máxima de inibição

Top = concentração de resposta de 50% a resposta máxima

HillSlope = inclinação da curva

4.8 Criopreservação das microalgas

Os cultivos de *C. muelleri* e *D. brasiliensis* foram homogeneizados manualmente e coletados, em triplicata, na fase estacionária de *C. muelleri*, de acordo com a curva de crescimento (16° dia de cultivo) e 20° dia de cultivo de cultivo de *D. brasiliensis*. Foi observado que nesta fase ocorre o crescimento máximo para as duas espécies, avaliado por contagem celular e densidade óptica (680nm) de cada cultivo, registradas em triplicata.

A criopreservação foi realizada com a adição dos crioprotetores DMSO e metanol, obedecendo a concentração inibitória mínima estabelecida nos testes de toxicidade de 2% e 3% v/v, respectivamente. Os volumes estão descritos na Tabela 5. Os criotubos foram homogeneizados em vórtex. Foi utilizado criotubo de polipropileno (GREINER BIO ONE) de 5,0 mL.

As amostras foram colocadas em ultrafreezer (INDREL SCIENTIFIC), sob temperatura de -80°C por 20 dias.

Tabela 5 - Volume de crioprotetor para volume de cultura criopreservada

Tratamento	Volume do cultivo (mL)	Volume do crioprotetor (mL)	Volume total (mL)
Controle	2,00	-	2,00
DMSO	1,96	0,04	2,00
Metanol	1,90	0,06	2,00

4.9 Descongelamento e curvas de crescimento pós-criopreservação

Todo o material utilizado para o descongelamento foi esterilizado em luz ultravioleta em fluxo unidirecional vertical (FUV 09 - Grupo VECO) por 20 minutos.

Para o descongelamento, os criotubos com as amostras foram retiradas do ultrafreezer, acondicionadas em caixa de isopor com gelo e colocadas em banho-maria a 35°C por um total de 2 minutos e 30 segundos, nesse período os criotubos foram verificados a cada 30 segundos, a fim de observar o descongelamento. O material foi colocado dentro de um tubo Falcon de capacidade de 15 mL e centrifugado a 5.000 RPM por 10 minutos (HN-S CENTRIFUGE). Em seguida o sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspensão em 2 mL dos respectivos meios de cultura.

As microalgas passaram por um período de adaptação nos criotubos, por 48 horas, sob as mesmas condições de temperatura e iluminação que os cultivos e transferidas para tubos de ensaio posteriormente. Em seguida, foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 200 mL de meio de cultivo. Após 15 e 20 dias foi feito um novo suplemento de meio, aumentando o volume de *Chaetoceros muelleri* e *Desmodesmus brasiliensis*, respectivamente, para 500 mL. Todas as fases de adaptação e aumento de cultivo pós-criopreservação ocorreram sob as mesmas condições de temperatura e iluminação pré-criopreservação.

As curvas de crescimento foram traçadas através da correlação entre a densidade óptica pelo tempo e comparada com a correlação entre a contagem celular em microscopia óptica pelo tempo, seguindo os mesmos protocolos executados para a elaboração das curvas pré-criopreservação.

4.10 Taxas de crescimento

As taxas de crescimento foram calculadas de acordo com a equação descrita abaixo (LOURENÇO, 2006):

$$k = \frac{\log_2 (N_t/N_0)}{\Delta t}$$

Onde:

N_t = número de células contadas no tempo final

N_0 = número de células contadas no tempo inicial

$\Delta t = t_t - t_0$ (intervalo de tempo decorrido entre as medidas de número de células)

4.11 Análises estatísticas

Os cálculos de IC50, médias e desvios padrão, bem como os gráficos apresentados, foram feitos utilizando o *software* GraphPad Prism versão 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimentos prévios

Os resultados demonstraram que nenhuma espécie marinha, com ou sem adição dos crioprotetores, sobreviveu à criopreservação sob a temperatura de -20°C. Entretanto, sob a temperatura de -80°C, *Chaetoceros gracilis*, *Diacronema lutheri*, *Dunaliella salina*, *Tetraselmis suecica* e *Tetraselmis chuii* sobreviveram à criopreservação sem adição dos crioprotetores, portanto, para esse tratamento o controle apresentou sobrevivência de 50% das espécies testadas. *C. gracilis*, *T. suecica* e *T. chui* sobreviveram ao tratamento com DMSO 10%, enquanto que *D. salina*, *T. suecica*, *T. chui* sobreviveram ao tratamento com glicerol 10%. As microalgas coletadas na fase estacionária apresentaram maior taxa de sobrevivência.

Entre as espécies dulciaquícolas, DMSO 5% gerou alta viabilidade das espécies descongeladas, seguido das amostras controle. Não houve sobrevivência de nenhuma espécie tratada com glicerol.

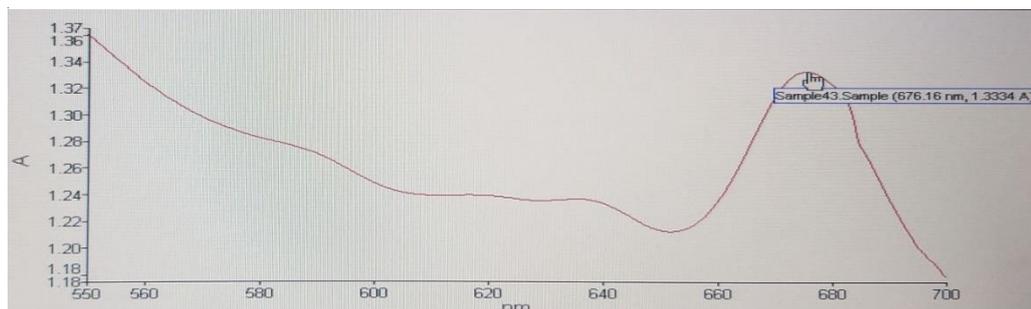
Chlorella vulgaris e *Coelastrum indicum* apresentaram melhores taxas de crescimento pós-criopreservação com maior viabilidade, nos grupos controle e nos tratados com DMSO.

A melhor fase de coleta para as dulciaquícolas foi a exponencial e a melhor temperatura de congelamento foi -80°C.

5.2 Análise por varredura espectrofotométrica

A varredura para avaliação do comprimento de onda com máxima absorção foi feita para as espécies *Chaetoceros muelleri* e demonstrou que o pico de absorção para essa espécie ocorre no comprimento de 680 nm (Figura 7).

Figura 7 - Espectro de absorção para *Chaetoceros muelleri*

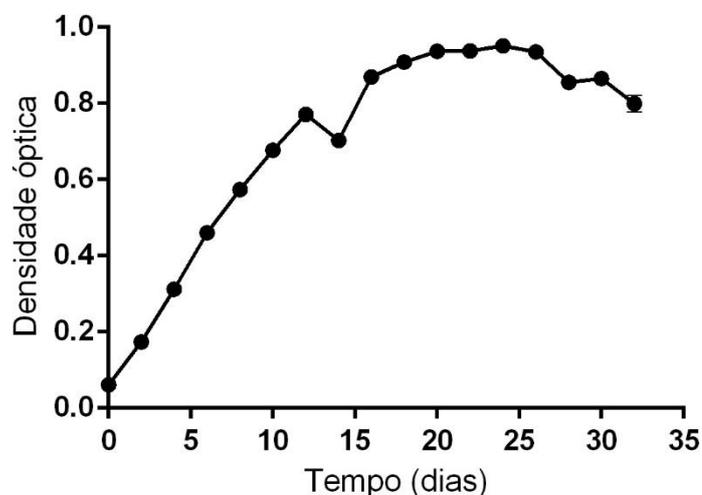


5.3 Crescimento pré-criopreservação

A curva de crescimento de *Chaetoceros muelleri* não apresentou uma fase lag (fase de latência ou de adaptação), o seu crescimento teve início na fase log (fase exponencial ou fase de crescimento).

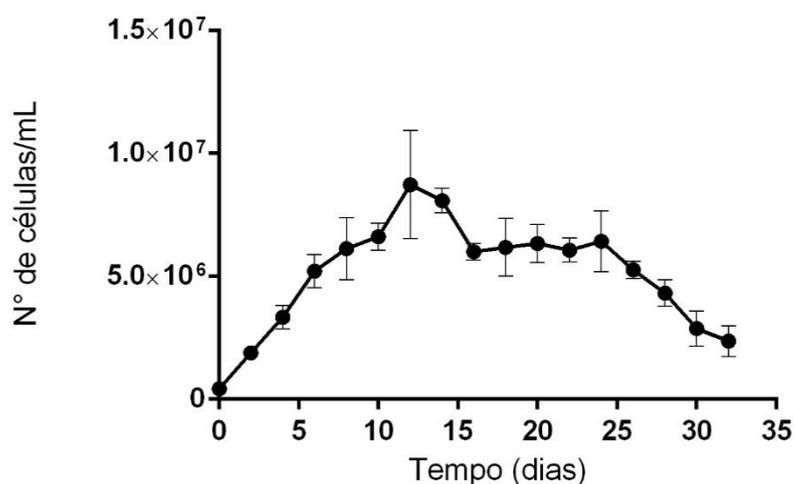
A curva de crescimento foi registrada por leitura da densidade óptica (D.O.). Os resultados demonstram que a fase log ocorreu do dia 0 (D.O. 0,061) até o 12° dia (D.O. 0,771), com queda para 0,703 no 14° dia, seguida pelo início da fase estacionária no 16° dia (D.O. 0,870), a qual teve duração até o 26° (D.O. 0,935), quando teve início a fase de declínio ou de morte no 28° dia (D.O. 0,856) (Figura 8).

Figura 8 - Curva de crescimento de *Chaetoceros muelleri* avaliada por leitura de absorbância à 680 nm



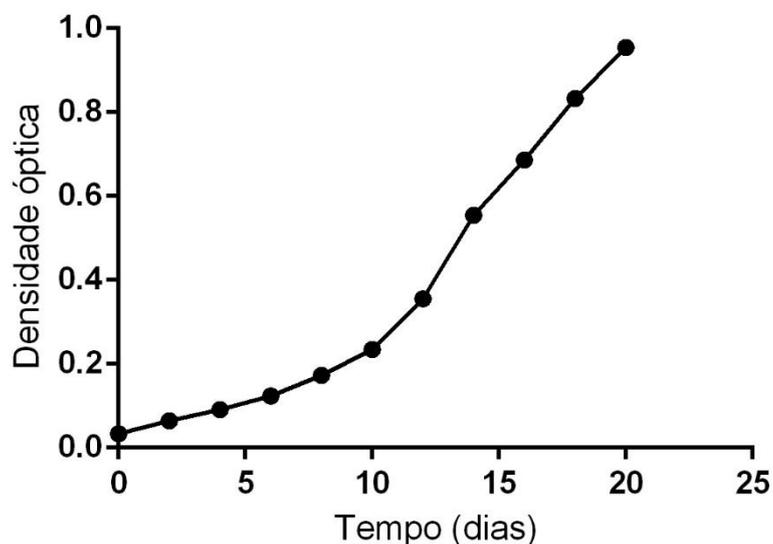
Em relação à curva elaborada por contagem celular (Figura 9) a fase log teve início no dia 0 havendo oscilação entre os dias 10 e 16, a partir do qual teve início a fase estacionária, esta fase se manteve até o dia 24, a partir do qual teve início a fase de declínio.

Figura 9 - Curva de crescimento de *Chaetoceros muelleri* avaliada por contagem celular



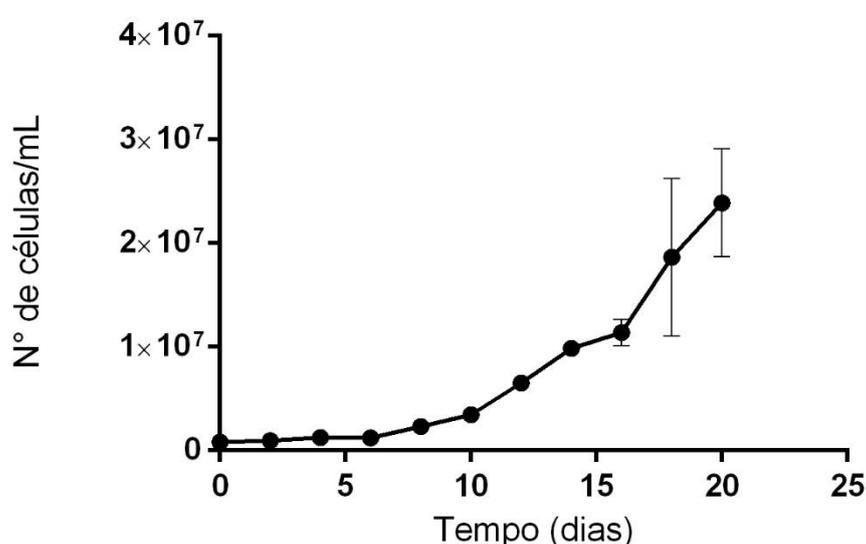
Desmodesmus brasiliensis foi acompanhada por 20 dias e de acordo com a leitura de absorbância (Figura 10) foi observado que apresentou fase lag entre os dias 0 (D.O. 0,034) e 6 (D.O. 0,123). A partir do 8º dia (D.O. 0,173) ocorreu o início da fase log. Até o 20º dia (D.O. 0,954) não houve redução da absorbância, ou seja, não haviam sido atingidas as fases estacionária e de declínio.

Figura 10 - Curva de crescimento de *Desmodesmus brasiliensis* avaliada por leitura da por absorbância à 680 nm



A curva de crescimento de *D. brasiliensis* elaborada com base no número de células/mL (Figura 11) se assemelha àquela elaborada a partir da absorbância em relação à duração da fase lag, pois também tem duração do dia 0 até o 6º dia. A partir do 6º dia, observa-se um aumento progressivo no número de células apontando o início da fase log. Também se observa a ausência das fases estacionária e de declínio durante os 20 dias de registro.

Figura 11 - Curva de crescimento de *Desmodesmus brasiliensis* avaliada por contagem celular



5.4 Adaptação de protocolo para uso de azul de Trypan

Azul de Trypan é um corante orgânico derivado da toluidina ou do tolueno, usado para diferenciar pela coloração células viáveis daquelas inviáveis. A padronização do protocolo para determinação de toxicologia usando o azul de Trypan frente a *Chaetoceros muelleri* indicou que o corante interage com o meio de cultivo Conway, sendo necessária, a remoção do meio através de centrifugação e ressuspensão em solução salina 28‰, o uso da solução se fez necessário por se tratar de uma microalga marinha. Após esse procedimento não houve formação de agregados do corante, porém a coloração das microalgas inviáveis foi bastante fraca impossibilitando a distinção daquelas viáveis durante a contagem celular.

A coloração azul das células indica se elas estão mortas ou danificadas, uma vez que nestas condições a membrana foi rompida, ou teve sua permeabilidade

seletiva alterada, permitindo a passagem do corante e sua visualização no interior da célula. Células microalgais viáveis deveriam manter a coloração apropriada de seu cultivo (verde ou marrom a depender da espécie). Porém, mesmo após o procedimento para adaptação de protocolo com *C. muelleri* ao azul de Trypan, utilizado também com *Desmodesmus brasiliensis*, não houve diferença significativa de coloração que tornasse possível diferenciar as células viáveis das inviáveis, quando exposta aos crioprotetores DMSO e metanol.

No entanto, outros autores também utilizaram o reagente para avaliar viabilidade celular, obtendo bons resultados. (WANG *et al.*, 2021) testaram a viabilidade da microalga marinha *Prorocentrum lima* após exposição à luz ultravioleta por meio do azul de Trypan e puderam observar que as células danificadas ficaram totalmente azuis, podendo ser facilmente diferenciadas das células viáveis. É possível que as alterações causadas pela luz UV (WANG *et al.*, 2021) tenham sido mais severas que as causadas pelo calor e pelos agentes crioprotetores induzidas neste trabalho, já que não foram observadas alterações morfológicas em *C. muelleri* e *D. brasiliensis* em contraste ao exibido por Wang *et al.*.

Chan *et al.* (2020) relataram que a presença do azul de Trypan pode formar corpos de coloração azul claro que podem não ser bem percebidas durante a contagem, o que torna os resultados imprecisos. Os autores utilizaram uma mistura de células Jurkat (linfócitos T) vivas e mortas por calor e propuseram que essas últimas exibem um padrão diferente daquelas mortas naturalmente quando coradas, aumentando a intensidade da cor azul. Dessa forma, o mesmo pode ter ocorrido com as células de *C. muelleri* mortas por calor, enquanto que nos testes de toxicidade com DMSO e metanol essa distinção entre viáveis e inviáveis não foi evidente.

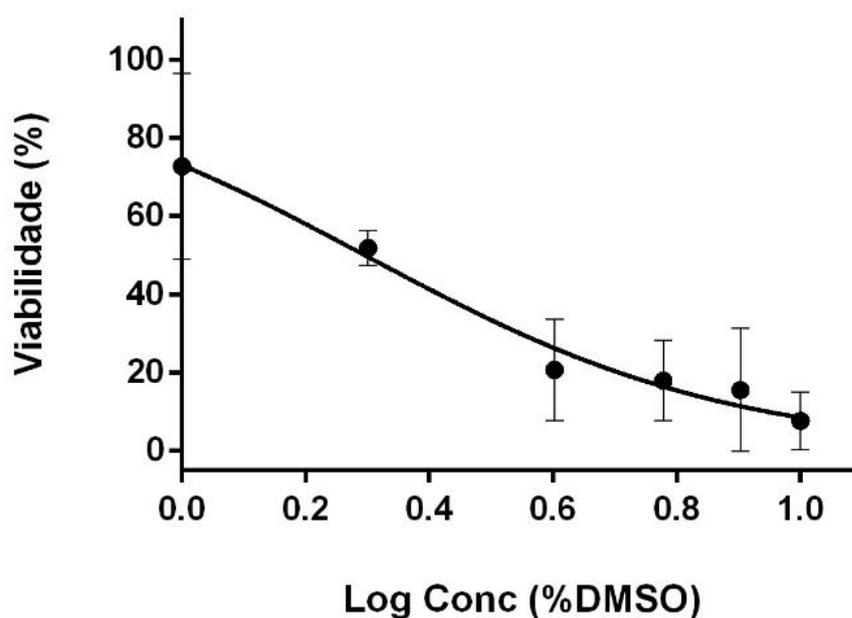
Tennant (1964) discute que ainda que uma propriedade considerada, neste caso a seletividade da membrana celular, não tenha sofrido danos é possível que as células não estejam em condições de se multiplicar, ou seja, a impermeabilidade celular ao corante não é um indicativo concreto da sua viabilidade.

5.5 Teste de toxicidade de DMSO e metanol frente a *Chaetoceros muelleri* e *Desmodesmus brasiliensis* por contagem celular

A fim de testar a toxicidade dos crioprotetores DMSO e metanol em relação às microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Desmodesmus brasiliensis* foram testadas diferentes concentrações dos solventes, em curvas de crescimento pré-criopreservação.

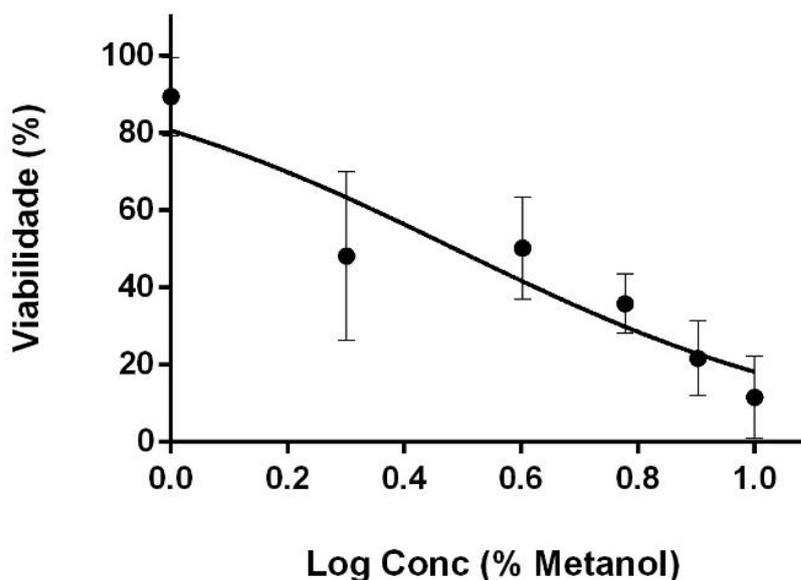
Os resultados foram obtidos por contagem celular (conforme descrito anteriormente) e mostram que a viabilidade de *C. muelleri* teve redução média para 51,9% quando exposta ao DMSO em uma concentração de 2%, na concentração de 4% a média da viabilidade caiu para 20,77% e foi reduzida até a concentração máxima utilizada de 10%, na qual a média foi 7,67% (Figura 12).

Figura 12 - Relação entre o percentual de viabilidade de *Chaetoceros muelleri* e a concentração de DMSO



A mesma microalga teve sua viabilidade média de 48,2% quando exposta a metanol sob concentração de 2%, se manteve próxima na concentração de 4% do solvente (50,2%) e a partir de 6% foi inferior a 35,8% (Figura 13).

Figura 13 - Relação entre o percentual de viabilidade de *Chaetoceros muelleri* e a concentração de Metanol

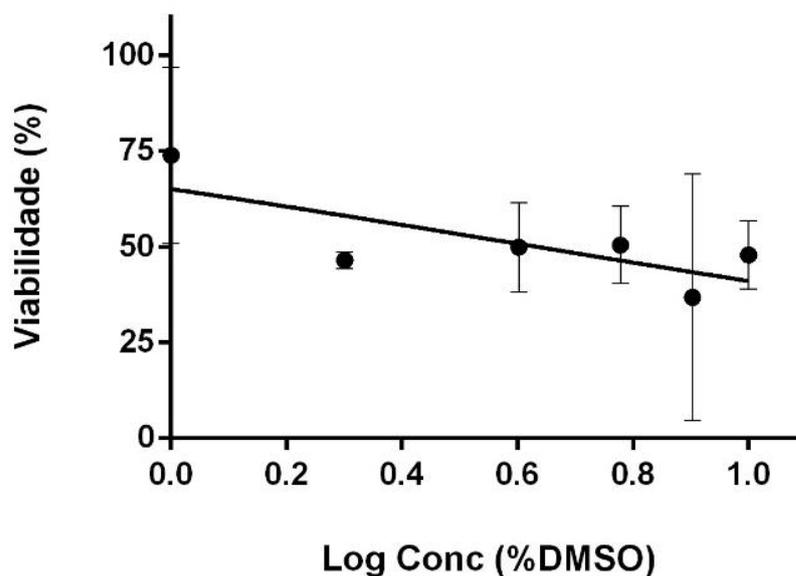


Gwo *et al.* (2005) avaliaram a toxicidade de diferentes crioprotetores frente à microalga marinha *Nannochloropsis oculata*. A coleta ocorreu durante a fase log. *N. oculata* foi exposta a DMSO, etileno glicol, glicerol, metanol e propileno glicol nas concentrações de 10% a 50% v/v por 10 a 30 min, as amostras foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em meio. A viabilidade foi avaliada por contagem após 7 dias de cultivo. A toxicidade de DMSO e metanol foi observada em concentrações acima de 30%.

Embora, *N. oculata* seja uma microalga marinha, assim como *C. muelleri*, a diferença da concentração tóxica entre elas pode ser explicada por pertencerem a diferentes filos, Ochrophyta e Bacillariophyta, respectivamente.

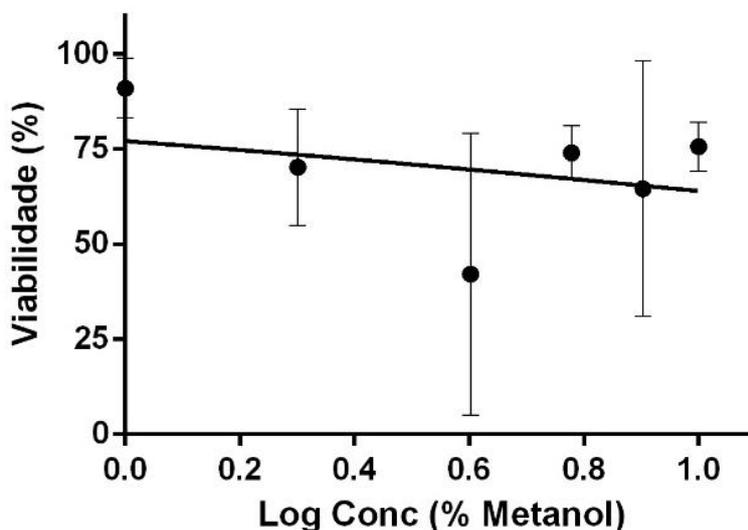
Os valores da viabilidade média de *D. brasiliensis* não obedeceram à curva dose-resposta sob os tratamentos com DMSO e metanol. A viabilidade média variou entre 36,83% (DMSO 8%) e 50,47% (DSMO 6%). Nota-se que o DMSO apresentou efeito de redução da viabilidade para 46,54% mesmo sob a menor concentração, ou seja, 2% (Figura 14).

Figura 14 - Relação entre o percentual de viabilidade de *Desmodesmus brasiliensis* e a concentração de DMSO



Em relação ao metanol observou-se que houve variação entre 42,12% e 75,64%, a redução de viabilidade em relação ao controle (90,94%) foi observada a partir de 2% de metanol, demonstrando não ser um bom crioprotetor para esta cepa (Figura 15).

Figura 15 - Relação entre o percentual de viabilidade de *Desmodesmus brasiliensis* e a concentração de Metanol



5.6 Crescimento pós-criopreservação

As microalgas utilizadas no presente estudo foram retiradas do ultrafreezer após 20 dias sob temperatura de -80°C .

Na retirada de *Chaetoceros muelleri* do ultrafreezer foi observado que as microalgas apresentavam coloração rosada sob todos os tratamentos (controle, DMSO e metanol). *C. muelleri* tem coloração marrom alaranjada quando em condições favoráveis para o seu crescimento, a cor rosada é observada quando as culturas estão em fase avançada de morte celular, isso indica que a cepa não sobreviveu ao processo de congelamento. Um possível crescimento da microalga foi testado realizando o protocolo de descongelamento e mantendo-a sob sua condição padrão de temperatura e iluminação pelos 2 dias de adaptação em criotubo e, posteriormente, transferida para Erlenmeyer com maior volume de meio, entretanto, não houve nenhum crescimento da mesma.

Rhodes *et al.* (2006) testaram a criopreservação de *Chaetoceros muelleri* em duas etapas com DMSO nas concentrações de 10% e 15%. Na primeira etapa a amostra foi exposta à uma redução lenta da temperatura, que passou de 20°C a -40°C com redução de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ durante 10 minutos, já na segunda etapa foi submersa em nitrogênio líquido (-196°C) Os autores apontam que as duas concentrações de DMSO testadas foram capazes de gerar resultados positivos com a sobrevivência de *C. muelleri*.

Cañavates e Lubian (1995) testaram o congelamento de outra espécie do gênero *Chaetoceros*, a *C. gracilis*, em nitrogênio líquido (-196°C) por 3 a 7 semanas. *C. gracilis* apresentou melhor viabilidade apenas na salinidade mais alta em todas as taxas de resfriamento testadas e níveis de crioprotetores. *C. gracilis* apresentou viabilidade de 11,7% com DMSO 5% e salinidade de 36‰, um valor equivalente ao observado com DMSO 15% e 20‰ de salinidade. Entretanto uma viabilidade média mais alta (21,6%) foi alcançada com o uso de DMSO 15% e salinidade de 36‰, embora os autores ponderem que uma concentração excessiva de sal dissolvido pode gerar estresse.

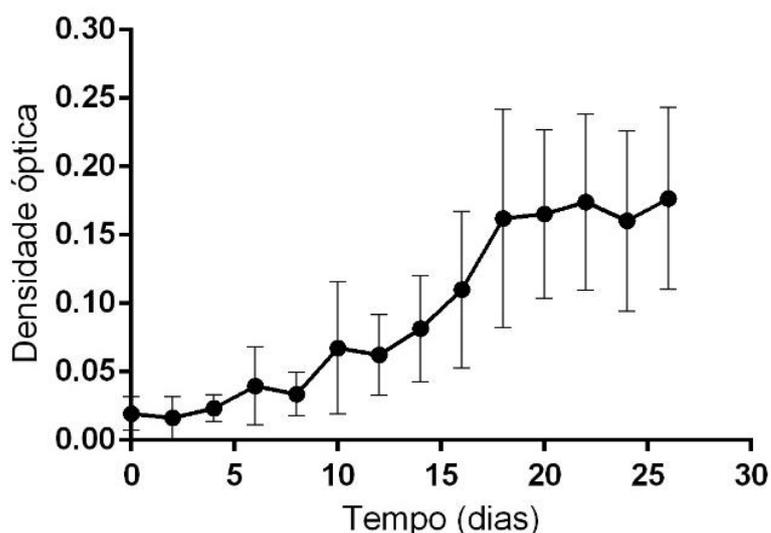
No trabalho realizado por Chellappan *et al.* (2020) não obtiveram viabilidade de *C. gracilis* quando congelada sob temperatura de -20°C por 30 dias e 6 meses com taxa de resfriamento de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, entretanto, houve viabilidade na condição de -196°C , com taxa de resfriamento de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, pelo mesmo período de tempo (taxas

de sobrevivência de 52% com DMSO 10% e 43% com metanol 10% após 30 dias e de 48% com DMSO 10% após 6 meses). Em ambas temperaturas foram aplicados DMSO 10% e metanol 10%. As cepas foram coletadas na fase log, centrifugadas e adicionadas aos crioprotetores. O descongelamento foi realizado com imersão dos criotubos em banho-maria por 5 minutos a 35°C, as microalgas foram então mantidas em ambiente escuro por 40 minutos e posteriormente mantida sob condições para o crescimento.

Após o descongelamento, *Desmodesmus brasiliensis* exibiu crescimento para todos os tratamentos e foi possível elaborar as curvas de crescimento a fim de comparar os resultados com a curva feita antes da criopreservação.

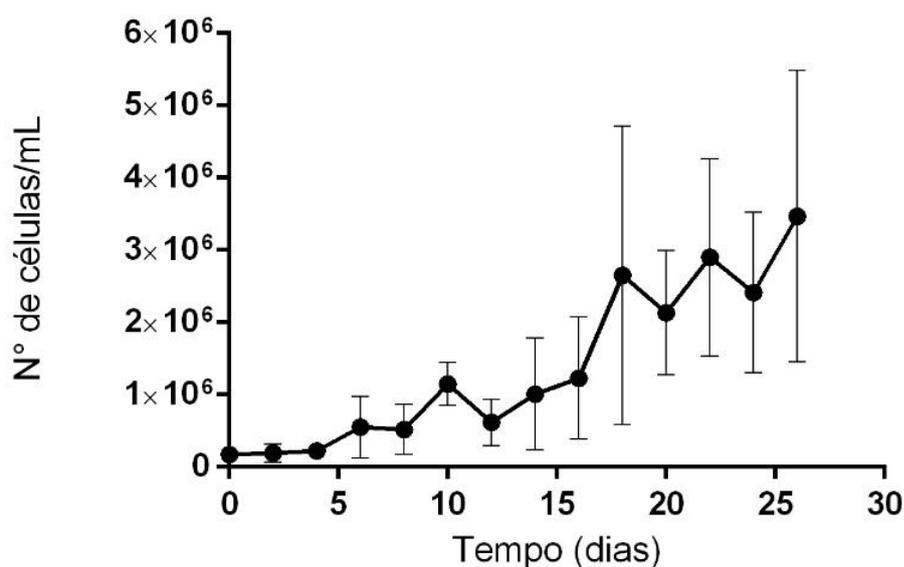
No controle foi observada fase lag com duração do dia 0 (D.O. 0,019) até o 4º dia (D.O. 0,023) de acordo com a curva feita a partir da absorbância. O número de células/mL indicou a mesma duração da fase lag. A curva para absorbância mostra que a fase log teve início no 6º dia (D.O. 0,040) e terminou no 18º dia (D.O. 0,162) quando tem início a fase estacionária. Até o 26º dia não houve fase de declínio (Figura 16).

Figura 16 - Curva de crescimento de *Desmodesmus brasiliensis* por densidade ótica Pós-criopreservação - controle



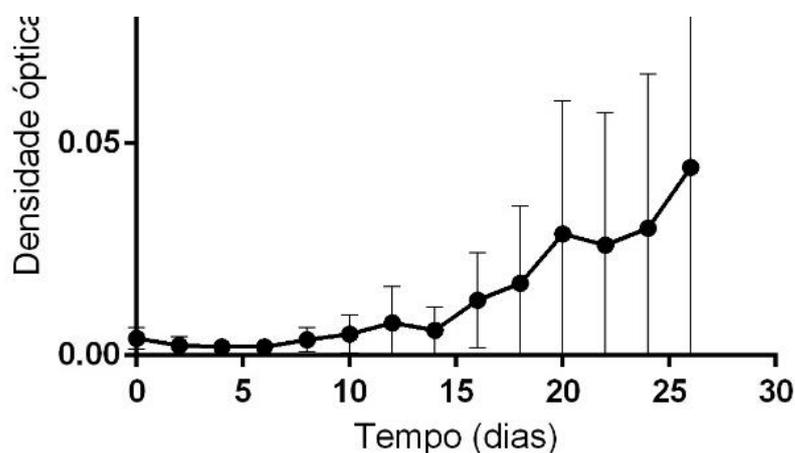
A curva registrada por contagem celular demonstra que houve fase lag até o 10º dia e o crescimento se manteve, também não houve fase de declínio até o 26º dia (Figura 17).

Figura 17 - Curva de crescimento de *Desmodesmus brasiliensis* por contagem celular Pós-criopreservação - controle



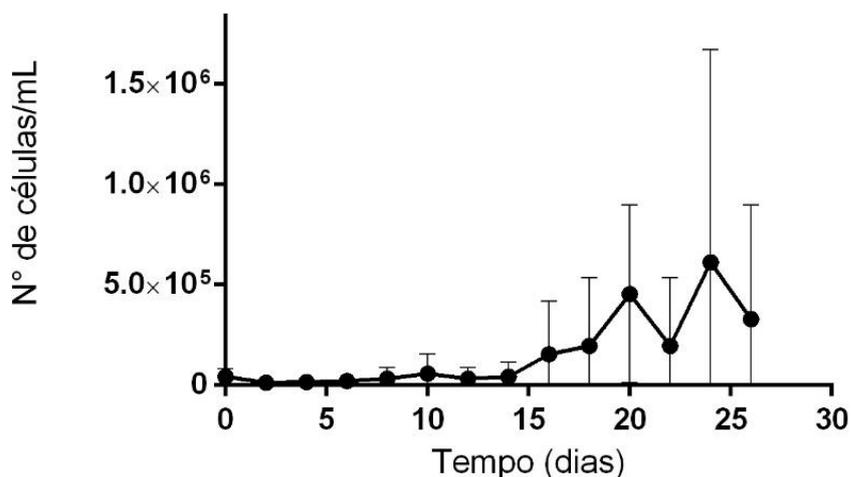
As alíquotas criopreservadas com metanol exibiram valores mais baixos registrados para absorvância e contagem celular quando comparadas ao controle (sem criopreservantes). A fase lag teve duração até o 8º dia (D.O. 0,0037) e a partir do 10º dia (D.O. 0,005) é observado o início da fase log, e até o 26º dia não foi atingida a fase estacionária (Figura 18).

Figura 18 - Curva de crescimento de *Desmodesmus brasiliensis* por densidade óptica Pós-criopreservação - Metanol



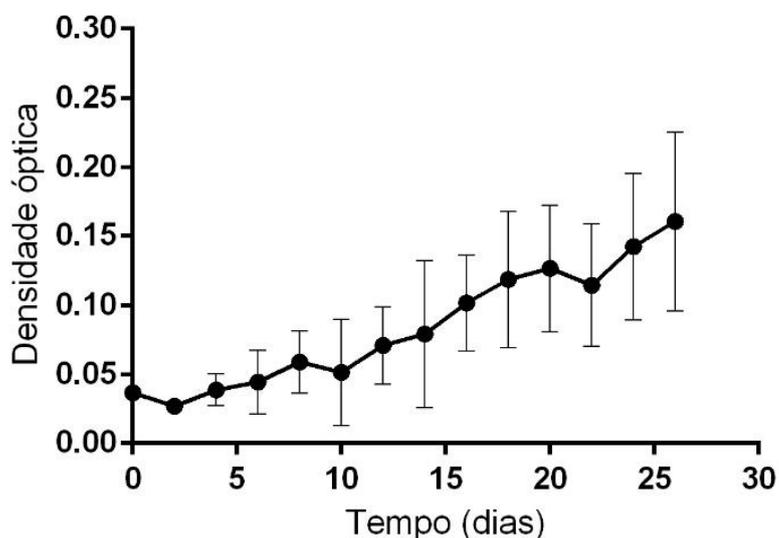
A contagem celular indicou que a fase log teve início a partir do 16º dia. A partir deste ponto houve oscilação dos valores e também indica que a fase estacionária não foi atingida (Figura 19).

Figura 19 - Curva de crescimento de *Desmodemus brasiliensis* por contagem celular Pós-criopreservação – Metanol



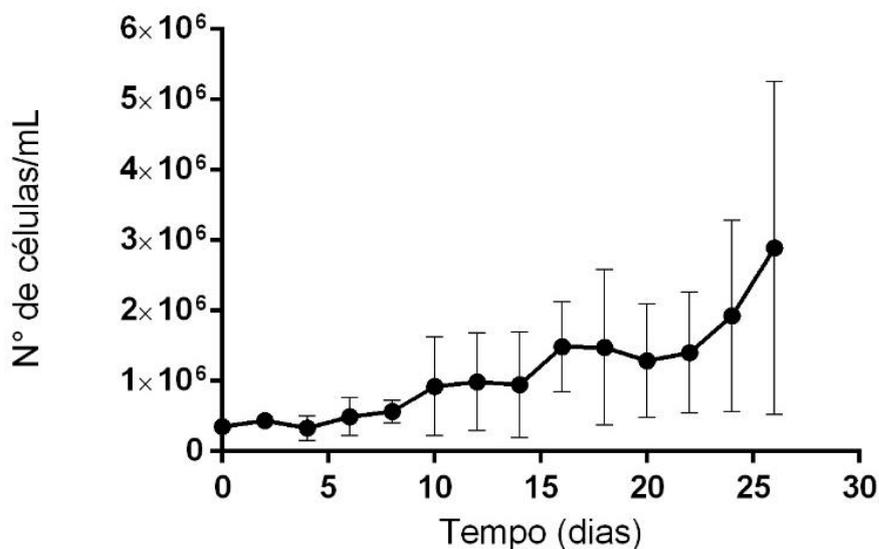
Na curva de crescimento das alíquotas tratadas com DMSO registrada com os dados da absorbância há um período de adaptação (fase lag) do dia 0 (D.O. 0,037) ao 4º dia (D.O. 0,039). A partir do 6º dia (D.O. 0,044) é observado que tem início a fase log que se manteve até o 26º dia (D.O. 0,016), ou seja, assim como no tratamento com metanol a fase estacionária não foi atingida dentro do período de observação (Figura 20).

Figura 20 - Curva de crescimento de *Desmodemus brasiliensis* por densidade ótica Pós-criopreservação - DMSO



A curva registrada com a contagem celular exibiu diferença de duração da fase lag quando comparada aos valores de absorbância e, portanto, diferença no dia inicial da fase log. Nesta curva a fase lag tem duração do dia 0 até o 10º dia, quando tem início a fase log (Figura 21).

Figura 21 - Curva de crescimento de *Desmodemus brasiliensis* por contagem celular Pós-criopreservação - DMSO



No estudo realizado por Galvão, Yamanaka e Tanji (1996) também foi observado atraso no crescimento de *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis tetraathele* quando submetidas a congelamento a uma temperatura de -5°C . A fase lag foi mais longa e sua duração aumentou quando maior o período de armazenamento.

Bui *et al.* (2013) utilizaram método de criopreservação em dois passos para avaliar a viabilidade de *Scenedesmus dimorphus* (pertencente à mesma família que *D. brasiliensis*). Primeiramente as amostras foram coletadas na fase estacionária, submetidas a -80°C com queda de temperatura $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e em seguida houve imersão em nitrogênio líquido. *S. dimorphus* foi mantida nestas condições por, pelo menos 24 horas. *S. dimorphus* passou por descongelamento em temperatura ambiente, centrifugação, ressuspensão e disposição em placas de ágar para avaliação do crescimento por unidades formadoras de colônia. Os autores concluíram que a concentração ideal para a espécie foi DMSO 6,5% e que a eliminação da centrifugação a fim de minimizar o dano celular, a redução da concentração celular (tendo em vista a redução de componentes tóxicos produzidos pela parede celular) e

o uso de baixos níveis de luz durante a fase de recuperação auxiliaram no crescimento após a criopreservação.

Prieto-Guevara *et al.* (2023) analisaram por citometria de fluxo os danos celulares causados pela criopreservação de *sp.* utilizando DMSO 5% e metanol 10%. Após 5 dias de recuperação foi observado que com o uso de DMSO 5%, 50% das células não sofreram nenhum dano em comparação ao controle, em que 100% sofreu algum dano. Entretanto, o emprego de metanol 5%, provocou as maiores taxas de crescimento, tempo de duplicação e rendimento das amostras coletadas na fase exponencial. O congelamento de *Scenedesmus sp.* ocorreu em três etapas, primeiro as amostras foram mantidas por 30 minutos com os crioprotetores, em seguida acondicionadas em nitrogênio líquido, inicialmente por 30 minutos e, por fim, mantidas por 48 horas, também em nitrogênio líquido.

5.7 Taxas de crescimento

A taxa de crescimento (k) de *Chaetoceros muelleri* foi calculada somente pré-criopreservação ($k = 0,077$), visto que não houve sobrevivência após a criopreservação com nenhum dos tratamentos aplicados.

O crescimento de *Desmodesmus brasiliensis* pode ser avaliado antes e depois da criopreservação. Foi observado que antes da criopreservação a taxa de crescimento ($k = 0,245$) foi maior que aquelas obtidas pós-criopreservação, tanto para o controle (sem criopreservantes) ($k = 0,167$) quanto para as alíquotas tratadas com metanol ($k = 0,115$) e DMSO ($k = 0,117$). Portanto a ausência de crioprotetores propiciou melhor recuperação para *D. brasiliensis* após o congelamento a -80°C . Já no cultivo com os crioprotetores, o DMSO exibiu maior taxa de crescimento do que o metanol.

6. CONCLUSÃO

Os testes preliminares a este trabalho, realizados com vinte espécies do Banco de Microalgas do IBio/UFBA, indicaram que a melhor fase de coleta de microalgas marinhas para a criopreservação foi a fase estacionária e para as dulciaquícolas a fase exponencial.

Entre as espécies marinhas 4 sobreviveram à criopreservação sem adição dos crioprotetores, 3 espécies após tratamento com DMSO e 4 espécies com glicerol, ambos a 10%. Para as espécies dulciaquícolas, os tratamentos controle e DMSO 5% alcançaram alta viabilidade e o tratamento com glicerol não obteve nenhuma viabilidade pós-criopreservação.

O protocolo de criopreservação com o armazenamento das microalgas em ultrafreezer sob temperatura de -80°C demonstrou ser a melhor temperatura para a criopreservação das microalgas marinhas e dulciaquícolas do banco, entretanto nenhuma espécie sobreviveu ao congelamento na temperatura de -20°C .

O pico de absorção máxima de *Chaetoceros muelleri* ocorre no comprimento de 680 nm, corroborando com a literatura, portanto este foi o comprimento de onda utilizado nos testes de absorbância.

Embora o protocolo realizado para redução da formação de agregados tenha obtido sucesso, o corante azul de Trypan não foi eficaz para avaliar a viabilidade de *C. muelleri* e *Desmodemus brasiliensis*, visto que não propiciou suficiente coloração das microalgas para distinguir viáveis de inviáveis, sugerindo que novas técnicas precisam ser testadas.

Os crioprotetores DMSO e metanol exibiram alta toxicidade para *C. muelleri* mesmo nas menores concentrações testadas (2%), sugerindo que não são adequados para o protocolo de criopreservação da espécie em passo único a -80°C . *D. brasiliensis* não obedeceu à uma curva dose-resposta para os crioprotetores, entretanto, também houve alta redução da viabilidade nas concentrações de 2% dos crioprotetores.

Entre as duas microalgas testadas no presente estudo, foi possível criopreservar *D. brasiliensis*, ainda que sem a adição de crioprotetores, apresentando a maior taxa de crescimento. *Chaetoceros gracilis* não sobreviveu à etapa do congelamento, portanto é necessário testar novos crioprotetores e metodologias de criopreservação para a espécie.

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que é possível criopreservar espécies mantidas em meio líquido em bancos, embora sejam necessários novos estudos a fim padronizar e obter metodologias espécie-específicas.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 236–251, 2008.

AGUIAR, T. D. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; TELES, C. H. A.; MARTINS, G. R.; BEZERRA JÚNIOR, R. Q.; COSTA, E. C. Princípios básicos da criomicrobiologia: Enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 80–93, 2012.

AMARAL, R.; PEREIRA, J. C.; PAIS, A. A. C. C.; SANTOS, L. M. A. Is axenicity crucial to cryopreserve microalgae? **Cryobiology**, v. 67, n. 3, p. 312–320, 2013.

ANDRADE, B. B.; CARDOSO, L. G.; ASSIS, D. J.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I.; LIMA, S. T. C. Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 340–348, 2019.

ARAY-ANDRADE, M. M.; UYAGUARI-DIAZ, M. I.; BERMÚDEZ, J. R. Short-term deleterious effects of standard isolation and cultivation methods on new tropical freshwater microalgae strains. **PeerJ** 6:e5143, 2018.

BARROS, M. U. G.; COELHO, A. A. DA C.; DA SILVA, J. W. A.; BEZERRA, J. H. C.; MOREIRA, R. T.; FARIAS, W. R. L.; MOREIRA, R. L. Lipid content of marine microalgae *Chaetoceros muelleri* Lemmermann (Bacillariophyceae) grown at different salinities. **Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 1, 2014.

BENHRA, A.; RADETSKI, C. M.; FÉRARD, J. F. Cryoalgotox: use of cryopreserved alga in a semistatic microplate test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 505-508, 1997.

BLATT, R. J. R. Banking Biological Collections: Data Warehousing, Data Mining, and Data Dilemmas in Genomics and Global Health Policy. **Community Genet**, v. 3, n. 4, p. 204-211, 2000.

BLINN, D. W. Growth responses to variations in temperature and specific conductance by *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). **British Phycological Journal**, v. 19, n. 1, p. 31–35, 1984.

BORODA, A.V.; AIZDAICHER, N. A.; ODINTSOVA, N. A. The influence of ultra-low temperatures on marine microalgal cells. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 387–397, 2014.

BUI, T. V. L.; ROSS, I. L.; JAKOB, G.; HANKAMER, B. Impact of procedural steps and cryopreservation agents in the cryopreservation of chlorophyte microalgae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

BURGE, D. R. L.; EDLUND, M. "*Chaetoceros muelleri*." **Diatoms of North America**. v. 2, 2017.

CAÑAVATE, J. P.; LUBIAN, L. M. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae *Marine Biology*. **Marine Biology**, v. 124, p. 325-334, 1995.

CARNEIRO, D. C.; OLIVEIRA, M. M.; LIMA, S. T. C. Estimating protein quantities from microalgae: protein per biomass percentage, spectroscopic concentration, and lectin content. **Chemical Papers**, v. 73, n. 10, p. 2535–2540, 2019.

CHAN, L. L. Y.; RICE, W. L.; QIU, J. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, 2020.

CHARLES, C. N.; MSAGATI, T.; SWAI, H.; CHACHA, M. Microalgae: An alternative natural source of bioavailable omega-3 DHA for promotion of mental health in East Africa. **Scientific African**, v. 6, e00187, 2019.

CHEKANOV, K.; VASILIEVA, S.; SOLOVCHENKO, A.; LOBAKOVA, E. Reduction of photosynthetic apparatus plays a key role in survival of the microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) at freezing temperatures.

Photosynthetica, v. 56, n. 4, p. 1268–1277, 2018.

CHELLAPPAN, A.; THANGAMANI, P.; THANGASWAMY, S.; MARKOSE, S.; GANAPATHI, U.; THAVASIMUTHU, C.; MARIAVINCENT, M. B. Development of alternative technology for the long-term storage of microalgal stock culture in fish hatcheries. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 11, 2020.

CHEN, H.; WANG, Z.; XU, X.; GONG, S.; YU, Z.; ZHOU, Y. The microscopic structure of 1-Methoxyethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide (EOMIMTFSI) during dilution with polar solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 322, 2021.

COLLINS, T.; MARGESIN, R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 2857–2871, 2019.

DA SILVA, A. A.; FONSECA, G. G. Bioprospection of freshwater microalgae from Bonito, MS, Brazil. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 10, n. 3, p. 117–121, 2018.

DAY, J. G. Cryopreservation: Fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections. **Nova Hedwigia**, v. 79, n. 1–2, p. 191–205, 2004.

DAY, J. G.; TYTOR, S.; EGARDT, J.; APPLGREN, M.; RAD-MENÉNDEZ, C.; CHEPURNOVA, O.; VYVERMAN, W.; GODHE, A. Challenges for the maintenance and cryopreservation of multiple isolates of model microorganisms: an example using the marine diatom *Skeletonema marinoi*. **Biopreservation and Biobanking**, v. 15, n. 3, p. 191–202, 2017.

DING, X.; ZHANG, H.; LIU, W.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Extraction of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen white Salted Noodles. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 842–852, 2014.

DUYGU, D.; UDO UDOH, A. U.; ÖZER, T.; A. ERKAYA, İ. Mikroalg kültür koleksiyonlarının özellikleri ve önemi. **Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi**, v. 13, n. 1, p. 80–80, 2017.

ESKANDARI, A.; LEOW, T. C.; RAHMAN, M. B. A.; OSLAN, S. N. Antifreeze proteins and their practical utilization in industry, medicine, and agriculture. **Biomolecules**, v. 10(12), 1649, 2020.

FALCÃO, V. G. O.; CARNEIRO, D. C.; PEREIRA, S. A.; DA SILVA, M. R. D.; CANDÉ, A. A.; DA CUNHA LIMA, S. T. Analyzing the toxicity of bisphenol-A to microalgae for ecotoxicological applications. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 1, 2020.

FERNANDES, M. S.; CALSING, L. C. G.; NASCIMENTO, R. C.; SANTANA, H.; MORAIS, P. B.; DE CAPDEVILLE, G.; BRASIL, B. S. A. F. Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. **Algal Research**, v. 38, 2019.

FERNANDES, M. S.; MORAIS, P. B.; CARVALHO, R. Efeito da morfologia celular e fase de crescimento algal na eficiência da criopreservação de microalgas. *In*: III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia: Anais. Processos Bioquímicos.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, v. 25(6), p. 375-388, 2004.

GALVÃO, M. S. N.; YAMANAKA, N.; TANJI, S. Preservação de duas microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis tetrahele* por resfriamento e congelamento. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 23, 1996.

GANESAN, R.; MANIGANDAN, S.; SAMUEL, M. S.; SHANMUGANATHAN, R.; BRINDHADEVI, K.; LAN CHI, N. T.; DUC, P. A.; PUGAZHENDHI, A. A review on prospective production of biofuel from microalgae. **Biotechnology Reports**, v. 27, e00509, 2020.

GARCÍA, J. L.; DE VICENTE, M.; GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microbial Biotechnology**, v. 2783, 2017.

GARRIDO-CARDENAS, J.; ALONSO, D.; GARCÍA-MAROTO, F.; HAN, X. Evaluation and optimization of a methodology for the long-term cryogenic storage of *Tetradismus obliquus* at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 5, 2019.

GWO, J. C.; CHIU, J. Y.; CHOU, C. C.; CHENG, H. Y. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 338–343, 2005.

HA, J. S.; LEE, J. W.; SEO, S. H.; AHN, C. Y.; RHO, G. J.; LEE, H. G.; OH, H. M. Optimized cryopreservation of *Ettlia* sp. using short cold acclimation and controlled freezing procedure. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 4, p. 2277–2287, 2019.

HAMDAN, A. Psychrophiles: Ecological significance and potential industrial application. **Academy of Science of South Africa**, v. 114, n. 5-6, 2018.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 205–229, 2003.

HULAI, O.; HULAI, V.; TKACHUK, N. Biotic relations between pathogenic leptospire and green algae. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 77, n. 3, p. 99–107, 2021.

DE PAUW, N., JOHNSON, M. K.; JOHNSON, E. J.; MACELROY, R. D.; SPEER, H. L.; BRUFF, B. S.; MORALES, J.; PERSOONE, G. Mass culture of microalgae in

aquaculture systems: Progress and constraints. **J. Bacteriol**, v. 95, p. 1461–1468, 1980.

KAPOORE, R. V.; HUETE-ORTEGA, M.; DAY, J. G.; OKUROWSKA, K.; SLOCOMBE, S. P.; STANLEY, M. S.; VAIDYANATHAN, S. Effects of cryopreservation on viability and functional stability of an industrially relevant alga. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

KARLSSON, J. O. M.; TONER, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues. **Biomaterials**, v. 17, n. 3, p. 243–256, 1996.

KIM, H. J.; LEE, J. H.; HUR, Y. B.; LEE, C. W.; PARK, S. H.; KOO, B. W. Marine antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. **Marine Drugs**, v. 15, n. 2, 2017.

KLANČIČ, V.; GOBEC, M.; JAKOPIN, Ž. Halogenated ingredients of household and personal care products as emerging endocrine disruptors. **Chemosphere**, v. 3030, 2022.

KOBIYAMA, A.; TANAKA, S.; KANEKO, Y.; LIM, P. T.; OGATA, T. Temperature tolerance and expression of heat shock protein 70 in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). **Harmful Algae**, v. 9, n. 2, p. 180–185, 2010.

KUGLER, A.; KUMARI, P.; KOKABI, K.; ITKIN, M.; MALITSKY, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I. Resilience to freezing in the vegetative cells of the microalga *Lobosphaera incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 56, n. 2, p. 334–345, 2020.

LAURITANO, C.; RIZZO, C.; GIUDICE, A.; SAGGIOMO, M. Physiological and molecular responses to main environmental stressors of microalgae and bacteria in polar marine environments. **Microorganisms**, v. 8, 1957, 2020.

LEE, R.E. **Phycology**, 4. Ed. Cambridge University Press, New York, 2008.

LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. **Marine Drugs**, v. 14, n. 10, p. 1–19, 2016.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Rima Editora. 2006.

MARGESIN, R.; FELLER, G. Biotechnological applications of psychrophiles. **Environmental Technology**, v. 31, p. 835–844, 2010.

M.D. GUIRY in GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 09 June 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
<https://www.algaebase.org>; searched on 09 June 2023.

MENDES, M. C. Q.; GONZALEZ, A. A. C.; MENEZES, M.; NUNES, J. M. C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO, I. A. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26(3), p. 691-696, 2012.

MINHAS, A. K.; HODGSON, P.; BARROW, C. J.; ADHOLEYA, A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

MOHEIMANI, N. R.; VADIVELLOO, A.; AYRE, J. M.; PLUSKE, J. R. Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent. **Algal Research**, v. 35, p. 362–369, 2018.

MORSCHETT, H.; REICH, S.; WIECHERT, W.; OLDIGES, M. Simplified cryopreservation of the microalga *Chlorella vulgaris* integrating a novel concept for cell viability estimation. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 36–44, 2016.

MÜLLER, J.; DAY, J. G.; HARDING, K.; HEPPELLE, D.; LORENZ, M.; FRIEDL, T. Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation

using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **American Journal of Botany**, v. 94, n. 5, p. 799–808, 2007.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. L. N.; BARROS, D. A. **Manual de cultivo de microalgas**, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.; DRUZIAN, J. I.; DE SOUZA, C. O.; VICH, D. V.; DE CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2013.

OKUMURA, Y.; KOYAMA, J.; TAKAKU, H.; SATOH, H. Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, n. 2, p. 123–128, 2001.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 459–466, 2003.

PAREDES, E.; BELLAS, J. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal nt. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, n. JUL, 2019.

PIASECKI, B. P.; DILLER, K. R.; BRAND, J. J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell density. **Cryobiology**, v. 58, n. 1, p. 103–109, 2009.

PICHRTOVÁ, M.; HÁJEK, T.; ELSTER, J. Osmotic stress and recovery in field populations of *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta) on Svalbard (High Arctic) subjected to natural desiccation. **Microbiology Ecology**, v. 89., p. 270–280, 2014.

PITT, K. E., **2008 Best Practices for Repositories - Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research**, 2. Ed. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), 2007.

PRIETO-GUEVARA, M.; ALARCÓN-FURNIELES, J.; JIMÉNEZ-VELÁSQUEZ, C.; HERNÁNDEZ-JULIO, Y.; ESPINOSA-ARAUJO, J.; ATENCIO-GARCÍA, V. Cryopreservation of the microalgae *Scenedesmus* sp. **Cells**, v. 12, n. 4, 2023.

PUSHKAREVA, E.; JOHANSEN, J. R.; ELSTER, J. A review of the ecology, ecophysiology and biodiversity of microalgae in Arctic soil crusts. **Polar Biol**, v. 39, p. 2227–2240, 2016.

PYKE, G. H.; EHRLICH, P. R. Biological collections and ecological/environmental research: A review, some observations and a look to the future. **Biological Reviews**, v. 85, n. 2, p. 247–266, 2010.

RAMOS, L. C.; BATISTA, R.; CARNEIRO, D. C.; SOUSA, L. J.; SALES, A. N.; LIMA, S. T. C. Evaluation of electroflocculation harvesting on the antioxidant activity and toxicity of extracts from the microalgae *Isochrysis galbana* and *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 6, p. 3853–3859, 2020.

REDDY, B. M.; CHATURVEDI, A. *Scenedesmus* and related genera in riverine system of Chandrapur district, Maharashtra. **Phykos**, v. 45, n. 2, p. 19-28, 2015.

RHODES, L.; SMITH, J.; TERVIT, R.; ROBERTS, R.; ADAMSON, J.; ADAMS, S.; DECKER, M. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. **Cryobiology**, v. 52, n. 1, p. 152–156, 2006.

RICCIO, G.; LAURITANO, C. Microalgae with immunomodulatory activities. **Marine Drugs**, v. 18(1): 2, 2020.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 709-722, 2017.

SCHUELTER, A. R.; KROUMOV, A. D.; HINTERHOLZ, C. L.; FIORINI, A.; TRIGUEROS, D. E. G.; VENDRUSCOLO, E. G.; ZAHARIEVA, M. M.; MÓDENES, A. N. Isolation and identification of new microalgae strains with antibacterial activity on food-borne pathogens. Engineering approach to optimize synthesis of desired metabolites. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 28–39, 2019.

SILKINA, A.; NELSON, G. D.; BAYLISS, C. E.; POOLEY, C. L.; DAY, J. G. Bioremediation efficacy—comparison of nutrient removal from an anaerobic digest waste-based medium by an algal consortium before and after cryopreservation. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 3, p. 1331–1341, 2017.

STOCK, W.; PINSEEL, E.; DE DECKER, S.; SEFBOM, J.; BLOMMAERT, L.; CHEPURNOVA, O.; SABBE, K.; VYVERMAN, W. Expanding the toolbox for cryopreservation of marine and freshwater diatoms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

TAYLOR, R.; FLETCHER, R. L. Cryopreservation of eukaryotic algae - A review of methodologies. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 5, p. 481–501, 1998.

TENNANT, J. R., Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, v. 2, n. 6, 1964.

TESSAROLLI, L. P.; DAY, J. G.; VIEIRA, A. A. H. Estabelecimento de um biobanco criopreservado para a coleção de culturas de microalgas de água-doce (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 2, 2017.

THIRUVARASN, L.; SANGEETHA, P. J.; SAMPATHKUMAR, P.; SUNDARAPANDIYAN, B. Microalgae harvesting by flocculation method. **International Journal of Advanced Research in Biological Science**, v. 2(12), p. 387-393, 2015.

TSAI, S.; CHONG, G.; MENG, P. J.; LIN, C. Sugars as supplemental cryoprotectants for marine organisms. **Reviews in Aquaculture**, v.10, p. 703–715, 2018.

TZOVENIS, I.; TRIANTAPHYLLIDIS, G.; NAIHONG, X.; CHATZINIKOLAOU, E.; PAPADOPOULOU, K.; XOURI, G.; TAFAS, T. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. **Aquaculture**, v. 230, n. 1–4, p. 457–473, 2004.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, S. V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VU, C. H. T.; LEE, H. G.; CHANG, Y. K.; OH, H. M. Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 380-396, 2018.

WALLS, R. L.; DECK, J.; GURALNICK, R.; BASKAUF, S.; BEAMAN, R.; BLUM, S.; BOWERS, S.; BUTTIGIEG, P. L.; DAVIES, N.; ENDRESEN, D.; GANDOLFO, M. A.; HANNER, R.; JANNING, A.; KRISHTALKA, L.; MATSUNAGA, A.; MIDFORD, P.; MORRISON, N.; TUAMA, É. Ó.; SCHILDHAUER, M.; SMITH, B.; STUCKY, B. J.; THOMER, A.; WIECZOREK, J.; WHITACRE, J.; WOOLEY, J. Semantics in support of biodiversity knowledge discovery: An introduction to the biological collections ontology and related ontologies. **Ontologies for Biodiversity Science**, v. 9, n. 3, 2014.

WANG, Y.; JU, P.; WANG, S.; SU, J.; ZHAI, W.; WU, C. Identification of living and dead microalgae cells with digital holography and verified in the East China Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 163, 2021.

WOLKERS, W. F., OLDENHOF, H. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Humana Press, 2015.

WU, Y. H.; HU, H. Y.; YU, Y., ZHANG, T. Y.; ZHU, S. F.; ZHUANG, L. L.; ZHANG, X.; LU, Y. Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 675-688, 2014.

XIANG, H.; YANG, X.; KE, L.; HU, Y. The properties, biotechnologies, and applications of antifreeze proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 661-675, 2020.

XING, C.; LI, J.; YUAN, H.; YANG, J. Physiological and transcription level responses of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* to cold and heat induced oxidative stress. **Environmental Research**, v. 211, 2022.

YANG, D.; LI, W. Methanol-promoted lipid remodelling during cooling sustains cryopreservation survival of *Chlamydomonas reinhardtii*. **PloS one**, 11(1), e0146255, 2016.

YEATES, D. K.; ZWICK, A.; MIKHEYEV, A. S. Museums are biobanks: unlocking the genetic potential of the three billion specimens in the world's biological collections. **Current Opinion in Insect Science**, v. 18, p. 83-88, 2016.

ZHENG, L.; LU, Z., ZHANG, Q.; LI, T.; SONG, L. A fluorescence ratio-based method to determine microalgal viability and its application to rapid optimization of cryopreservation. **Cryobiology**, v. 81, p. 27-33, 2018.

ZHOU, Y.; GONG, S.; XU, X.; YU, Z.; KIEFER, J.; WANG, Z. The interactions between polar solvents (methanol, acetonitrile, dimethylsulfoxide) and the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(fluorosulfonyl)imide. **Journal of Molecular Liquids**, v. 299, 2020.