



**Universidade Federal do Tocantins  
Campus Universitário de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**MAIARA SOUSA FERNANDES**

**Desenvolvimento de métodos otimizados para criopreservação de  
microalgas verdes (Chlorophyta)**

**GURUPI - TO  
2017**



**Universidade Federal do Tocantins  
Campus Universitário de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**MAIARA SOUSA FERNANDES**

**Desenvolvimento de métodos otimizados para criopreservação de  
microalgas verdes (Chlorophyta)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo  
Brasil

Co-orientadora: Dra. Lorena Costa Garcia

**GURUPI - TO  
2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins**  
**Campus Universitário de Gurupi**

---

**Cutter** Fernandes, Maiara Sousa.  
Desenvolvimento de métodos otimizados para criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta) / Maiara Sousa Fernandes - Gurupi, 2017.  
xxf. (quantidade de folhas)

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.  
Linha de pesquisa:  
Orientador: Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

1. Palavra-chave. 2. Palavra-chave. 3. Palavra-chave. I. Sobrenome, Nome. (orientador) II. Universidade Federal do Tocantins. III.

---

**Bibliotecária: Emanuele Santos**  
**CRB-2 / 1309**

**TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.**



Universidade Federal do Tocantins  
Campus Universitário de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Defesa nº**

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MAIARA SOUSA FERNANDES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.**

---

*Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar*  
Universidade Federal do Tocantins

---

*Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu*  
Universidade Federal do Tocantins

---

*Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil*  
Universidade Federal do Tocantins/ Embrapa Agroenergia  
Orientador e presidente da banca examinadora

Gurupi, 23 de Fevereiro de 2017.

*Dr. Gessiel Newton Scheidt*  
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sua proteção, por me conceder sabedoria, coragem e força para superar as dificuldades e não desistir dos meus objetivos, por me amparar nos momentos difíceis, me mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais Maria Aparecida Fernandes e Edgard Fernandes, pelo amor, confiança, por estarem sempre ao meu lado me dando forças e me fazendo acreditar que posso sempre mais.

Ao meu namorado Gustavo André Colombo, por seu companheirismo, compreensão, apoio e amizade em todos os momentos, sobretudo nos mais difíceis.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil e Dra. Lorena Costa Garcia pela confiança, dedicação, ensinamentos, profissionalismo e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos analistas do Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB) da Embrapa Agroenergia, em especial à Thais Demarchi Mendes e Thályta Fraga Pacheco pela prontidão, e boa vontade com que sempre me auxiliaram e acolheram minhas dúvidas.

Ao Dr. Félix Gonçalves de Siqueira pelo incentivo à pesquisa científica e pela forma gentil e atenciosa com que me recebeu todas as vezes que precisei.

Aos companheiros de pesquisa Rodrigo Carvalho dos Santos e Priscila Borges Morais pelas contribuições neste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) da Universidade Federal do Tocantins, pela oportunidade de fazer parte do curso de mestrado, e à Embrapa Agroenergia por oferecer a estrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos membros da banca examinadora estendo o profundo agradecimento.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas	Vi
Lista de Figuras	vii
<b>1 Introdução geral .....</b>	<b>8</b>
<b>2 ARTIGO - Métodos otimizados para a criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta) com diferentes morfologias celulares .....</b>	<b>17</b>
1 Introdução	19
2 Material e métodos	21
2.1 Cepas de microalgas	21
2.2 Cultivo algal	23
2.3 Criopreservação	23
2.4 Quantificação da viabilidade celular	24
2.5 Otimização da criopreservação algal	25
3 Resultados e discussão	27
3.1 Avaliação dos agentes crioprotetores mais eficazes	27
3.2 Otimização da criopreservação algal	29
3.3 Validação das condições otimizadas de criopreservação	38
4 Conclusões	40
5 Referências bibliográficas	41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação molecular das estirpes estudadas, incluindo o percentual de identidade, número de acesso eo nome das espécies identificadas na base de dados GenBank (com base nas sequências marcadoras 16S, rbcL e ITS2). 22
- Tabela 2.** Matriz do planejamento (DCCR) com as variáveis reais e codificadas. 25
- Tabela 3.** Taxas de viabilidade celular (%) das cepas *Desmodesmus sp.* Embrapa|LBA#35, *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40, obtidas para cada condição do DCCR (Tabela 2), 0h e 24h após o descongelamento. 31
- Tabela 4.** Coeficientes de regressão de segunda ordem codificados para a viabilidade celular (%) das cepas *Desmodesmus sp.* Embrapa|LBA#35, *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 obtidas em 0h e 24h após o descongelamento. As células algais foram congeladas em três fases distintas do crescimento celular: Fase exponencial (3º dia de cultivo), fase de desaceleração (6º dia de cultivo) e fase estacionária (9º dia de cultivo). 32

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microscopia ótica de contraste diferencial de fase (DIC), com ampliação de 1000x, das cepas: A) Embrapa|LBA#35 (*Desmodesmus* sp.) apresentando colônia de morfologia cenobial; B) Embrapa|LBA#39 (*Chlorella sorokiniana*) apresentado formas unicelulares cocóides; C) Embrapa|LBA#40 (*Chlamydomonas biconvexa*) apresentando colônia de morfologia palmelóide. 21
- Figura 2.** Triagem de agentes crioprotetores. As células algais foram congeladas após 9 dias de cultivo na presença de glicerol, DMSO e PEG 400 em concentração 10% (v/v). 27
- Figura 3.** Curvas de crescimento baseadas em densidade óptica das cepas Embrapa|LBA#35 (*Desmodesmus* sp.); Embrapa|LBA#39 (*Chlorella sorokiniana*); Embrapa|LBA#40 (*Chlamydomonas biconvexa*) cultivadas em meio BG-11 por um período de 10 dias com iluminação artificial 16.000 Lux, fotoperíodo 12h:12h claro/ escuro, temperatura de 30° C e aeração de 10L h<sup>-1</sup>. 29
- Figura 4.** Superfície de resposta e curvas de contorno da cepa *Desmodesmus* sp. Embrapa|LBA#35 a) 0h e b) 24h após o descongelamento. 34
- Figura 5.** Superfície de resposta e curvas de contorno da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 a) 0h e b) 24h após o descongelamento. 35
- Figura 6.** Superfície de resposta e curvas de contorno da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 a) 0h e b) 24h após o descongelamento. 36
- Figura 7.** Validação dos protocolos otimizados de criopreservação. As cepas algais indicadas foram congeladas após 3 (A-B) ou 6 (C-F) dias de cultivo na presença de DMSO 7% (v/v) (C-D) ou Glicerol 5% (v/v) + PEG400 5% (v/v) (A-B, E-F). 39



# 1 INTRODUÇÃO GERAL

Microalgas são micro-organismos eucarióticos fotossintéticos, distribuídos em diversos filos/divisões de protistas. Possuem capacidade de se adaptar a diversos ambientes, podendo assumir vários tipos de metabolismos, sendo capazes de uma mudança metabólica como resposta às mudanças das condições ambientais (ANGELO et al., 2015). O crescimento e a composição das microalgas são definidos pelas condições de cultivo. Podem crescer autotroficamente utilizando luz e dióxido de carbono, heterotróficamente, usando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou ainda em sistema de cultivo mixotrófico. Nesse sistema usam-se, simultaneamente, a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO<sub>2</sub> e substrato orgânico como fontes de carbono (CHOJNACKA & MARQUEZ-ROCHA, 2004).

As microalgas tem sido foco de muitos estudos nos últimos anos por possuírem ampla aplicabilidade nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, nas áreas da biomedicina e principalmente na área ambiental. Algumas das aplicações ambientais destes micro-organismos incluem a biofixação de CO<sub>2</sub>, remoção de matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, produção de biocombustíveis como biodiesel e bioetanol (SCHMITZ et al., 2012).

Estima-se que aproximadamente 350.000 espécies de microalgas existam em uma diversidade de habitats que variam desde fontes de águas frescas a fontes salinas e desde condições árticas até as termais (NORTON, 1996; LARKUM et al., 2012). Esta biodiversidade constitui uma excelente base para programas de melhoramento de microalgas dependentes de extensivas coleções de culturas.

A manutenção de coleções de algas em meio líquido ou semi sólido a base de agar, embora bem estabelecida, é trabalhosa, dispendiosa e sujeita à contaminação e à alteração

genética (TAYLOR & FLETCHER, 1999). A criopreservação oferece uma abordagem eficaz para o armazenamento a longo prazo de micro-organismos viáveis (HUBALEK, 2003). O objetivo principal deste processo é proteger as células das alterações não favoráveis de suas propriedades fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e genéticas (WATANABE & SAWAGUCH, 1995). As principais vantagens da criopreservação de microalgas são: disponibilidade de estirpes para cultura, baixo custo de manutenção, utilização otimizada de espaço e materiais, evita a deriva genética (KUWANO et al., 2004).

A aplicação da criopreservação às microalgas deve ser estudada para melhor compreensão dos graus de susceptibilidade e sensibilidade desses organismos. Uma série de fatores afetam a eficácia da criopreservação de microalgas, tais como espécies, tamanho e forma de célula, fase de crescimento celular, composição do meio de crescimento, teor de água da célula, composição do agente crioprotetor (ACP), temperatura e tempo de armazenamento, taxa de resfriamento e de descongelamento (TAYLOR & FLETCHER, 1999; RHODES et al., 2006; DAY & HARDING, 2007).

A composição dos ACPs utilizada para proteger as células durante o congelamento é um dos parâmetros mais importantes. Estes aditivos usados durante a conservação de micro-organismos a baixas temperaturas aumentam a taxa de sobrevivência das células ao procedimento (CRUTCHFIELD et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2012; ROCHA et al., 2012). Os crioprotetores envolvem uma variedade de compostos químicos, os quais dividem-se em duas categorias: os tipos penetrantes e os não penetrantes. O primeiro passa através das membranas celulares e reduzem a taxa de cristalização citoplasma através da diminuição da temperatura de congelamento da água intracelular (TAYLOR & FLETCHER, 1999). Para esse efeito, os CPAs reduzem a pressão osmótica no citosol. Os três CPAs mais utilizadas para a criopreservação de microalgas são o metanol (MeOH), dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol (HUBALEK, 2003). A segunda categoria de CPAs (não penetrantes) é menos tóxica

para a célula, porém menos usadas na criopreservação. Causam desidratação celular, reduzindo assim a quantidade de água disponível para formar gelo intracelular, são exemplos desta categoria a polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG).

A criopreservação inclui várias fases. A primeira consiste na preparação das culturas de microalgas, antes do congelamento, onde um agente crioprotetor (CPA) é adicionado à suspensão de células, para evitar o dano celular, devido à formação de gelo (DAY & BRAND, 2005). A segunda fase consiste em arrefecer a suspensão de células. Os dois métodos atualmente utilizados são: o congelamento lento e a vitrificação. No congelamento lento, a temperatura é reduzida gradativamente e a água do meio extracelular se cristaliza, o que aumenta a concentração de solutos fora da célula e atrai a água do meio intracelular. Já na vitrificação ocorre um resfriamento ultra rápido da solução e a subsequente formação de um estado vítreo dentro e fora da célula (SANTOS et al., 2010). A terceira fase consiste em aquecer a amostra de forma lenta ou rápida. Um descongelamento rápido, por exemplo por imersão em banho maria de água a 25-40 ° C, promove uma taxa de viabilidade mais elevada e diminui o tempo de contato com ACPs potencialmente tóxicos (CRUTCHFIELD et al., 1999; DAY et al., 1997; RHODES et al., 2006). Logo após o descongelamento, remove-se o ACP, e ressuspende-se as células em meio fresco.

A viabilidade pós-descongelamento (criovitalidade) é a forma utilizada para se estimar quantitativamente a sobrevivência das células e para comparar a eficiência dos métodos de criopreservação. Apesar de vários estudos realizados na área de criopreservação de algas (NAKANISHI et al., 2012; MORSCHETT et al., 2016; YANG & LI 2016), ainda não foram estabelecidos ensaios padronizados de viabilidade após o descongelamento. A avaliação da viabilidade por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) tem sido o método mais utilizado (BUI et al., 2013). Todavia, semanas de espera são necessárias até que as colônias cresçam o suficiente afim de que a contagem seja feita com precisão

(CRUTCHFIELD et al., 1999). Outros métodos rotineiramente utilizados incluem: i) avaliação da densidade celular por contagem direta em microscópio óptico (KUMARI, 2016; SALAS-LEIVA & DUPRÉ, 2011); ii) coloração com vermelho neutro, o qual avalia a viabilidade lisossomal das células por meio da incorporação do corante (BUHMAN, 2013; JO et al., 2003); iii) ensaio de exclusão do azul de Tripán, o qual avalia a integridade da membrana plasmática (SANTIAGO-VÁZQUEZ et al., 2007).

Ensaio de avaliação da atividade metabólica, como o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT), tem provado eficácia na avaliação pós-descongelamento de tecidos vegetais (JOSHI & TENG, 2000; MIKULA et al., 2006) e humanos (FRANCHINI et al., 2009; HWANG et al., 2015). Stork et al. (2013) e Kovácik et al. (2015) provaram a eficiência do método na avaliação da viabilidade de cepas de microalgas submetidas a estresses ambientais. No entanto, nenhum estudo foi conduzido utilizando o ensaio de CTT para avaliar viabilidade de microalgas criopreservadas. Por ser um método aplicado à cultura inteira, ao invés de exigir o exame de células individualmente, apresenta vantagem na economia de tempo, permite a identificação de diferentes níveis de viabilidade, e não está sujeito à interpretação do avaliador, implicando em maior precisão dos resultados. Além disso, não requer semanas de espera para ser aplicado, como é o caso do método de contagem de unidades formadoras de colônia (FRANÇA NETO, 1999; FOGAÇA, 2011).

O teste de tetrazólio, baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases nas células vivas. Estas enzimas catalisam reações respiratórias nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de Krebs (MENEZES et al., 1994). Durante a respiração ocorre a liberação de íons de hidrogênio, com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, incolor e solúvel, reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel denominada de formazam (KRZYŻANOWSKI et al., 1991; FRANÇA-NETO et al., 1998).

## 1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

K. Chojnacka, F.J. Marquez-Rocha, Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae, *Biotechnology*, 3 (2004) 21-34.

E.A. Angelo, D.S. Andrade, A. Colozzi Filho, Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral, *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 35 (2015) 125-136.

R. Schmitz, C.D. Magro, L.M. Colla, Aplicações Ambientais de Microalgas, *Revista CIATEC*, 4 (2012) 48-60.

T.A. Norton, M. Melkonian, R.A. Andersen, Algal biodiversity, *Phycological*, 35 (1996) 308–326.

R. Taylor, L. Fletcher, Cryopreservation of eukaryotic algae: a review of methodologies, *Journal of Applied Phycology*, 10 (1999) 481-501.

Z. Hubalek, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, *Cryobiology*, 46 (2003) 205–229.

M.M. Watanabe, T. Sawaguchi, Cryopreservation of a water-bloom forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, *Phycological Research*, 43 (1995) 111–116.

K. Kuwano, S. Kono, Y.H. Jo, J.A. Shin, N. Saga, Cryopreservation of the gametophytic cells of laminariales (phaeophyta) in liquid nitrogen, *Journal of Applied Phycology*, 40 (2004) 606-610.

L. Rhodes, J. Smith, R. Tervit, R. Roberts, J. Adamson, S. Adams, M. Decker, Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae, *Cryobiology*, 52 (2006) 152-156.

J. Day, K. Harding, Plant cryopreservation: a practical guide, SPRINGER, New York, 2007, pp. 95-116.

A. Crutchfield, K. Diller, J. Brand, Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), European Journal of Phycology, 34 (1999) 43-52.

M.F.G, Rocha, D.T. Lima, R.S.N. Brilhante, R.A. Cordeiro, A.J. Monteiro, C.E.C. Teixeira, J.F. Ribeiro, D.S.C.M. Castelo-Branco, J.J.C. Sidrim, Glucose and lactose as cryoprotectants for fungal strains immobilised in sodium alginate: an emphasis on the conservation of the zygomycetes *Rhizopus* and *Mucor*, Mycoses, 56 (2012) 321-326

A.F. Nascimento, A.C.S. Gonçalves, R.V. Reis Neto, M.C. Leal, A.T.M. Viveiros, Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*), Animal Reproduction, 9 (2012) 103-110.

J.G. Day, M.M. Watanabe, G.J. Morris, R.A. Fleck, M.R. Mclellan, Long-term viability of preserved eukaryotic algae, Journal of Applied Phycology, 9 (1997) 121–127.

R.R. Santos, C. Amorim, S. Cecconi, M. Fassbender, M. Imhof, J. Lornage, M. Paris, Cryopreservation of ovarian tissue: na emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds, Animal Reproduction Science, 122 (2010) 151-163.

K. Nakanishi, K. Deuchi, K. KUWANO, Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage, Journal Appl. Phycological, 24 (2012) 1381–1385.

H. Morschett, S. Reich, W. Wiechert, M. Oldiges, Simplified cryopreservation of the microalga *Chlorella vulgaris* integrating a novel concept for cell viability estimation, *Engineering Life Sciences*, 16 (2016) 36–44.

D. Yang, W. Li, W. Methanol-promoted lipid remodelling during cooling sustains cryopreservation survival of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plos One*, 11 (2016) 1-17.

T.V.L Bui, I.L. Ross, G. Jakob, B. Hankamer, Impact of Procedural Steps and Cryopreservation Agents in the Cryopreservation of Chlorophyte Microalgae, *Plos One*, 8 (2013) 1-9.

N. Kumari, M.K. Gupta, R.K. Singh, Open encapsulation-vitrification for cryopreservation of algae, *Cryobiology*, 73 (2016) 232-239.

J.S. Salas-Leiva, E. Dupré, Cryopreservation of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen): analysis of the effect of DMSO temperature and light regime during diferente equilibrium periods, *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39 (2011) 271-279.

M.T. Buhmann, J.G. Day, P.G. Kroth, Post-cryopreservation viability of the benthic freshwater diatom *Planothidium frequentissimum* depends on light levels, *Cryobiology*, 67 (2013) 23-29.

L.Z. Santiago-Vázquez, N.C. Newberger, R.G. Kerr, Cryopreservation of the dinoflagellate symbiont of the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*, *Marine Biology*, 152 (2007) 549-556.

A. Joshi, W.L. Teng, Cryopreservation of *Panax ginseng* cells, *Plant Cell Reports*, 19 (2000) 971-977.

A. Mikula, M. Niedzielski, J.J. Rybczynski, The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana spp.* cell suspension viability after cryopreservation, *Acta Physiologiae Plantarum*, 28 (2006) 315-324.

M. Franchini, D. Zanini, A. Bosinelli, S. Fiorini, S. Rizzi, C. D'aloja, A. Vassanelli, Evaluation of cryopreserved donor skin viability: the experience of the regional tissue bank of Verona, *Blood Transfus* 7 (2009) 100–105.

S.M. Hwang, J.S. Lee, H.D. Kim, Y.H. Jung, H.I. Kim, Comparison of the viability of cryopreserved fat tissue in accordance with the thawing temperature, *Archive Plast Surg.*, 42 (2015) 143–149.

F. Stork, M. Backor, B. Klejdus, J. Hedbavny, J. Kováčik, Changes of metal-induced toxicity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO modulators in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae), *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (2013) 5502–5511.

J. Kováčik, P. Babula, J. Hedbavny, O. Krystofová, I. Provaznik, Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object, *Chemosphere*, 120 (2015) 23-30.



C.A. Fogaça, R.S. Costa, F. De Simoni, E. Gerolineto, Teste de tetrazólio em sementes de *Sorghum bicolor* L., Revista de Biologia e Ciências da Terra, 11 (2011) 182-187.

J.B. França Neto, F.C. Krzyzanowski, N.P. Costa, O teste de tetrazólio em sementes de soja, Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72p.

F.C. Krzyzanowski, J.B. França Neto, A.A. Henning, Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas, Informativo ABRATES, 1 (1991) 15-50.

N.L. Menezes, T.L.D. Silveira, P.R. Passinato, Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de arroz, Revista Brasileira de Sementes, 16 (1994) 121-127.

## 2 ARTIGO

### **Métodos otimizados para a criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta) com diferentes morfologias celulares**

**Resumo** – Frente à importância da preservação dos recursos genéticos algais depositados em coleções de referência para o apoio de programas de melhoramento, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias para a conservação de microalgas em estado metabolicamente inativo por longos períodos. Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho estabelecer protocolos otimizados de criopreservação para espécies de microalgas com arquiteturas celulares distintas (colonial cenobial, cocóide unicelular e colonial palmeloide), determinando-se os parâmetros ótimos para o congelamento, incluindo a fase de crescimento algal, além do tipo e da concentração de agentes crioprotetores. Foram testados três agentes químicos crioprotetores: dois agentes com alta permeabilidade celular, Glicerol e Dimetilsulfóxido (DMSO), e um agente não-permeável, Polietilenoglicol 400 (PEG 400). A otimização das variáveis foi realizada empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>. Para a maioria das cepas unicelulares cocóides analisadas o congelamento durante a fase de desaceleração do crescimento algal (6º dia de cultivo) na presença do crioprotetor DMSO 7% (v/v) resultou nas taxas mais elevadas de viabilidade celular após a criopreservação (até 94%). Por outro lado, as taxas mais altas de recuperação da viabilidade celular de algas cenobiais (62,6%) foram obtidas mediante congelamento durante a fase de crescimento algal exponencial (3º dia de cultivo) na presença dos agentes glicerol e PEG 400 combinados na concentração de 5% (v/v) cada. Comportamento distinto também foi observado para as cepas palmelóides analisadas, com as taxas de recuperação mais elevadas (78,8%) tendo sido obtidas mediante congelamento durante a fase de desaceleração do

crescimento algal (6º dia de cultivo) na presença da combinação de agentes crioprotetores, glicerol (5% v/v) + PEG 400 (5% v/v). Os resultados obtidos sugerem que a morfologia apresentada pelo talo algal pode ser um bom indicador para a escolha do agente crioprotetor a ser utilizado para a criopreservação.

**Palavras-chave** – Microalgas; Criopreservação; Crioprotetores; DCCR.

**Abstract** - In view of the importance of preserving algal genetic resources deposited in reference collections for the support of enhancement programs, it is necessary to develop methodologies for the conservation of microalgae in a metabolically inactive state for long periods. In this context, the objective of this work was to establish optimized cryopreservation protocols for microalgae species with distinct cellular architectures (cenobial colonial, unicellular coccoid and palmeloid colonial), determining the optimal parameters for freezing, including the algal growth phase, and also the type and concentration of cryoprotective agents. Three cryoprotectants were tested: two agents with high cell permeability, Glycerol and Dimethylsulfoxide (DMSO), and a non-permeable agent, Polyethylene Glycol 400 (PEG 400). The optimization of the variables was carried out using a central composite rotational design (CCRD) 2<sup>2</sup>. For most of the single-celled coccoid strains analyzed, the freezing during the deceleration phase of algal growth (6th day of culture) in the presence of 7% DMSO cryoprotectant v/v) resulted in the highest rates of cell viability after cryopreservation (up to 94%). On the other hand, the highest rates of cellular viability of the cenobial algae (62.6%) were obtained by freezing during the exponential algal growth phase (3rd day of cultivation) in the presence of combined glycerol and PEG 400 agents in the concentration of 5% (v / v) for each one. Different behavior was also observed for the analyzed palmeloid strains, with the highest recovery rates (78.8%) being obtained by freezing during the deceleration phase of

algal growth (6th day of culture) in the presence of the combination of cryoprotectants, glycerol (5% v/v) + PEG 400 (5% v/v). The results obtained suggest that the morphology presented by the algal stem can be a good indicator for the choice of cryoprotectant to be used for cryopreservation.

Keywords – microalgae; cryopreservation; cryoprotectors; CCRD

## **1. Introdução**

Microalgas são micro-organismos promissores para a indústria de base biológica, fornecendo matéria-prima para a produção de energia, produtos químicos, alimentos, rações para animais e outros bioprodutos. O estabelecimento de coleções de referência que possam preservar por longo prazo os recursos genéticos da diversidade ficológica destes micro-organismos é fundamental para apoiar programas de melhoramento. Todavia, a manutenção de microalgas metabolicamente ativas durante longos períodos de tempo, através de subcultivos sucessivos, é um processo laborioso, caro e reconhecidamente susceptível a contaminações microbianas e perdas de variabilidade genética. Diferentemente, a manutenção destes microrganismos mediante congelamento (criopreservação) é uma ferramenta promissora para evitar tais problemas, uma vez que os mantém em um estado metabólico inativo (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

O desenvolvimento e otimização de processos de criopreservação não é trivial, uma vez que comumente ocorre extensa lise celular decorrente da formação de cristais de gelo intracitoplasmáticos durante o congelamento e consequente perda da viabilidade. De modo a

minimizar este fenômeno e incrementar a criovitalidade celular, diferentes substâncias químicas podem ser utilizadas como agentes crioprotetores (ACPs). Estas substâncias podem ser classificadas de acordo com a capacidade de penetração celular: crioprotetores intracelulares (Exs: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol); ou extracelulares (Exs: polietilenoglicol (PEG), sorbitol, manitol, trealose). Crioprotetores penetrantes (intracelulares) promovem rearranjo lipídico e proteico, resultando no aumento da fluidez da membrana e redução da formação de gelo intracelular (ROCHA et al., 2012). Já os crioprotetores extracelulares recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento (NASCIMENTO et al., 2012). Além da substância crioprotetora utilizada, características como espécie, estrutura celular (morfologia), fase de crescimento/cultivo, teor de água da célula e taxa de resfriamento podem afetar a criopreservação (HUBÁLEK et al., 2003; AGUIAR et al., 2012).

Estudos de Fleck et al., (2006) comprovaram a influência da taxa de resfriamento sobre a recuperação de células viáveis de cepas de *Euglena gracilis* criopreservadas, ao compararem o congelamento lento com taxa controlada ( $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) com o congelamento rápido obtido mergulhando-se os criotubos diretamente em nitrogênio líquido. O congelamento lento proporcionou a recuperação de 60% de células viáveis, ao passo que o procedimento de arrefecimento direto em nitrogênio líquido resultou em perda total da viabilidade. Tannioua et al., (2012) também observaram melhores resultados utilizando o congelamento com taxa de arrefecimento controlada para cepas de *Haslea ostrearia*, obtendo 75% de células viáveis com o congelamento lento e 20% utilizando o procedimento de congelamento rápido. Cañavate & Lubián (1997) investigaram os efeitos da idade da cultura (3, 7 e 14 dias) para a viabilidade após criopreservação de cinco cepas de microalgas e observaram maiores níveis de viabilidade em culturas em fase tardia, exceto para *Rhodomonas báltica*, a qual mostrou 45%,

42% e 35% de viabilidade respectivamente para células de 3, 7 e 14 dias de cultivo. Para as mesmas idades de cultura, a viabilidade de *Chaetoceros gracilis* foi de 25%, 28% e 36%. A criopreservação de *Tetraselmis chuii* não foi afetada pela idade de cultura e foi muito próxima de 100%. Em culturas de *Nannochloris atomus* com 3 dias de cultivo obteve-se 83% de viabilidade e 100% e 94% para culturas de 7 e 14 dias. Culturas de 3 dias de *Nannochloropsis gaditana* foram completamente inviabilizadas após o congelamento, já para culturas de 7 e 14 dias obteve-se viabilidades médias de 67%. Bui et al. (2013), testaram o efeito da criopreservação em 19 cepas de microalgas diferindo em tamanhos e morfologias. O método empregado pelos autores permitiu uma recuperação bem-sucedida para microalgas com tamanhos entre 3-50 µm de diâmetro. Esta escala de tamanho abrange uma ampla gama de algas. Contudo, algumas cepas não revelaram tendências claras em termos de tamanho, morfologia ou taxonomia.

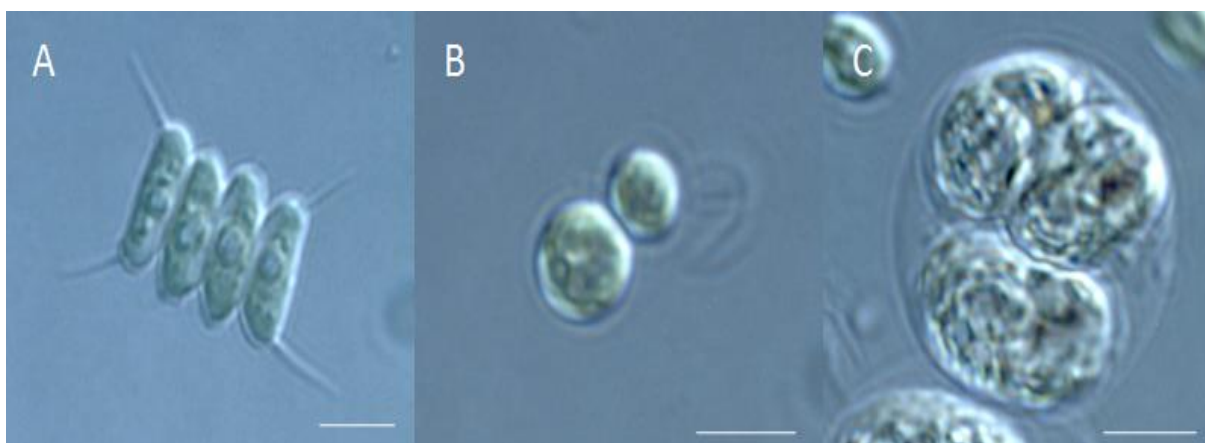
Diante do exposto, fica evidente a necessidade de melhorar as técnicas de criopreservação, compreendendo os principais passos do processo e otimizando cada um deles. Assim, objetivou-se com o presente trabalho estabelecer um protocolo de criopreservação para distintas espécies de microalgas, determinando os parâmetros ótimos de congelamento, incluindo a fase de multiplicação, o tipo e a concentração de agentes crioprotetores utilizados.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Cepas de microalgas*

Foram selecionadas a partir da coleção de micro-organismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia (Brasília-DF) (Hadi et al., 2016) 15 cepas de microalgas com

morfologias distintas (Figura 1): colonial cenobial (Embrapa|LBA#35, Embrapa|LBA#54, Embrapa|LBA#59, Embrapa|LBA#73, Embrapa|LBA#85), cocóide unicelular (Embrapa|LBA#32, Embrapa|LBA#36, Embrapa|LBA#39, Embrapa|LBA#61, Embrapa|LBA#77), e colonial palmeloide (Embrapa|LBA#6, Embrapa|LBA#8, Embrapa|LBA#40, Embrapa|LBA#48, Embrapa|LBA#51) (Tabela 1).



**Figura 1.** Microscopia ótica de contraste diferencial de fase (DIC), com ampliação de 1000x, das cepas: A) Embrapa|LBA#35 (*Desmodesmus* sp.) apresentando colônia de morfologia cenobial; B) Embrapa|LBA#39 (*Chlorella sorokiniana*) apresentando formas unicelulares cocóides; C) Embrapa|LBA#40 (*Chlamydomonas biconvexa*) apresentando colônia de morfologia palmelóide. Escala: 5 µm.

**Tabela 1.** Identificação molecular das estirpes estudadas, incluindo o percentual de identidade, número de acesso eo nome das espécies identificadas na base de dados GenBank (com base nas sequências marcadoras 16S, rbcL e ITS2).

Morfologia	Cepa	Acesso no GenBank	Marcador molecular	Identificação	Similaridade	Similaridade (GenBank)
Cenobial	Embrapa LBA#35	KT308071	ITS2	<i>Desmodesmus</i> sp.	99,0%	AB917128.1
	Embrapa LBA#54	-	ITS2	<i>Desmodesmus</i> sp.	98,0%	-

	Embrapa LBA#59	-	-	<i>Desmodesmus sp.</i>	-	-
	Embrapa LBA#73	-	-	<i>Desmodesmus sp.</i>	-	-
	Embrapa LBA#85	-	RbcL	<i>Scenedesmus sp.</i>	95,2%	-
	Embrapa LBA#32	KT308068	ITS2	<i>Micractinium sp.</i>	100%	FM205863.1
	Embrapa LBA#36	KT308072	ITS2	<i>Desmodesmus sp.</i>	100%	EU502836.1
Cocóide	Embrapa LBA#39	KT308075	ITS2	<i>Chlorella sorokiniana</i>	100%	KJ676113.1
	Embrapa LBA#61	-	-	NI	-	-
	Embrapa LBA#77	-	-	NI	-	-
	Embrapa LBA#6	KT308042	ITS2	<i>Chlamydomonadales sp.</i>	94%	AB983633.1
	Embrapa LBA#8	KT308046	ITS2	<i>Chlamydomonadales sp.</i>	87%	KM061447.1
Palmelóide	Embrapa LBA#40	KT308076	ITS2	<i>Chlamydomonadales sp.</i>	95%	FJ572059.1
	Embrapa LBA#48	KT308036	RbcL	<i>Chlamydomonadales sp.</i>	93%	AB603749.1
	Embrapa LBA51	KT308039	RbcL	<i>Chlamydomonadales sp.</i>	84%	FR865591.1

\*Não identificadas (NI)

## 2.2. Cultivo algal

As microalgas foram cultivadas em erlenmeyer (capacidade 500 ml) contendo 300 ml de meio BG11 (RIPPKA, 1979), inoculados com densidade óptica inicial ajustada para 0,01 (D.O=0,01 / comprimento de onda: 680 nm) e mantidos em sala de crescimento com iluminação artificial de 16.000 Lux, ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro, temperatura de 30°C, aeração de 10L h<sup>-1</sup>, por um período de 10 dias. O crescimento da biomassa foi monitorado pela densidade óptica das culturas a 680 nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX M3, Molecular Devices).



### *2.3 Criopreservação*

As suspensões de células algais foram ajustadas (centrifugadas e ressuspensas em meio fresco) para atingir uma densidade óptica igual a 1 ( $O. D = 1 / \text{comprimento de onda: } 680 \text{ nm}$ ) imediatamente antes da criopreservação para fins de normalização dos experimentos. Aliquotas das culturas (1,5 ml) foram transferidas para criotubos de polipropileno de 2 ml. Agentes crioprotetores (Glicerol, DMSO e PEG400) foram adicionados (ou não, no caso de amostras controle) nas concentrações indicadas. Os criotubos foram então inseridos em container de congelamento (Mr. Frosty™ Freezing Container) que permite uma taxa de resfriamento de aproximadamente  $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . O container foi colocado em ultrafreezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) e, após 4 horas, os criotubos congelados foram retirados do container, colocados em caixas de armazenamento e guardados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram por 15 dias.

Após 15 dias os criotubos foram retirados do ultrafreezer e submersos em banho-maria a  $35^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 2 min. Em seguida, o conteúdo dos criotubos foi pipetado para tubos de microcentrifuga de 2 ml e centrifugado por 5 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, o conteúdo celular foi ressuspensão em 3,5ml de meio BG-11 fresco e transferido para tubos de ensaio com tampa (20 x 150 mm). Os tubos foram mantidos em B.O.D com ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro e temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ .

### *2.4 Quantificação da viabilidade celular*

A viabilidade das amostras foi determinada aplicando-se o método do CTT (LIMA, 2014). O ensaio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias. Estas enzimas reduzem o sal de CTT (incolor) à

formazan nas células vivas. Os cristais de formazan resultantes apresentam cor vermelha e a intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, uma vez que a redução das taxas respiratórias reflete a atividade metabólica das células (CATALA et al., 2009). A viabilidade celular foi medida imediatamente após o descongelamento (0h) e decorridas 24h de cultivo pós-descongelamento.

Em tubos de ensaio, 1,5 ml de cada amostra foi homogeneizada em 3 ml do reagente CTT 0,5% (p/v) e então incubada por 24 h, no escuro, à 28° C. Após esse período, foram adicionados 6 ml de etanol 95% (v/v) e os tubos foram colocados em água fervente durante dez minutos, a fim de liberar o composto colorido formazan. O material foi então centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, para a separação dos sólidos, e o sobrenadante foi utilizado para as leituras de absorbância em espectrofotômetro (SPECTRAMAX M3, Molecular Devices) a 490 nm.

### *2.5 Otimização da criopreservação algal*

A viabilidade celular pós-congelamento foi analisada como resposta em três fases distintas do crescimento algal: Fase exponencial (3° dia de cultivo), fase de desaceleração (6° dia de cultivo) e fase estacionária (9° dia de cultivo). Empregou-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) aliado à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para investigar o efeito dos agentes crioprotetores – de forma individual e combinada (variáveis independentes) sobre a recuperação de células viáveis após o congelamento (variável dependente). As condições estudadas em cada planejamento realizado incluíram quatro pontos axiais e três repetições do ponto central, resultando em um total de 11 condições estudadas (Tabela 2). A equação polinomial 1 foi utilizada para ajustar os dados:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Onde  $\beta_n$  são coeficientes de regressão,  $y$  é a resposta, e  $x_1$  e  $x_2$  são as variáveis independentes codificadas (Glicerol e PEG400 para as microalgas Embrapa|LBA#35 e Embrapa|LBA#40; DMSO e Glicerol para a microalga Embrapa|LBA#39).

**Tabela 2.** Matriz do planejamento (DCCR) com as variáveis reais e codificadas.

Experimentos	Variáveis reais % (codificadas)					
	Embrapa LBA#35		Embrapa LBA#39		Embrapa LBA#40	
	<i>Glicerol</i>	<i>PEG 400</i>	<i>DMSO</i>	<i>Glicerol</i>	<i>Glicerol</i>	<i>PEG 400</i>
1	1,45 (-1)	1,45 (-1)	1,45 (-1)	1,45 (-1)	1,45 (-1)	1,45 (-1)
2	8,55 (+1)	1,45 (-1)	8,55 (+1)	1,45 (-1)	8,55 (+1)	1,45 (-1)
3	1,45 (-1)	8,55 (+1)	1,45 (-1)	8,55 (+1)	1,45 (-1)	8,55 (+1)
4	8,55 (+1)	8,55 (+1)	8,55 (+1)	8,55 (+1)	8,55 (+1)	8,55 (+1)
5	0 (-1,41)	5 (0)	0 (-1,41)	5 (0)	0 (-1,41)	5 (0)
6	10 (+1,41)	5 (0)	10 (+1,41)	5 (0)	10 (+1,41)	5 (0)
7	5 (0)	0 (-1,41)	5 (0)	0 (-1,41)	5 (0)	0 (-1,41)
8	5 (0)	10 (+1,41)	5 (0)	10 (+1,41)	5 (0)	10 (+1,41)
9	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)
10	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)
11	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)

Após a obtenção e avaliação dos coeficientes dos modelos obtidos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), que consiste na avaliação dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e do teste F, verificando se o modelo apresenta um ajuste adequado aos dados experimentais. O coeficiente de regressão ( $R^2$ ) mostra o quanto a regressão obtida explica as variações nos resultados. Quanto maior o  $R^2$ , mais próximos são os dados experimentais dos dados preditos e então mais confiável e preditivo é o modelo matemático obtido para

descrever o conjunto de dados. O ajuste da regressão e dos resíduos é avaliado comparando-se os valores de F calculado com o F tabelado.

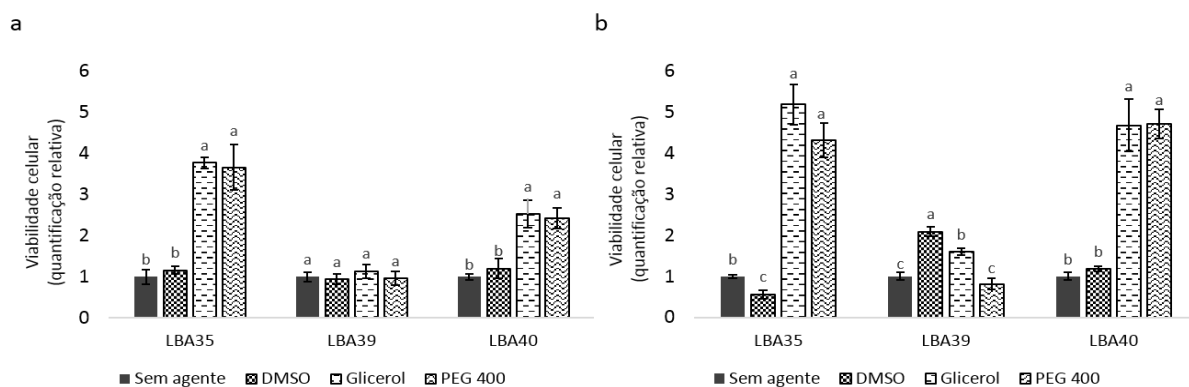
Os resultados da validação dos parâmetros otimizados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, com o auxílio do programa computacional STATISTICA (STATSOFT, 2007).

### **3. Resultados e discussão**

#### *3.1 Avaliação dos agentes crioprotetores mais eficazes*

Foram selecionadas 3 cepas de microalgas com morfologias distintas: colonial cenobial (Embrapa|LBA#35 *Desmodesmus* sp.), cocóide unicelular (Embrapa|LBA#39 *Chlorella sorokiniana*), e colonial palmeloide (Embrapa|LBA#40 *Chlamydomonas biconvexa*) (Figura 1) como protótipos para o desenvolvimento dos protocolos de criopreservação. Inicialmente, foram avaliados como crioprotetores dois agentes químicos com alta permeabilidade celular, Glicerol e Dimetilsulfóxido (DMSO), e um agente químico não-permeável, Polietilenoglicol 400 (PEG 400). Na Figura 2 estão apresentados os resultados de viabilidade celular imediatamente após o descongelamento (Figura 2A) e 24h pós-descongelamento (Figura 2B) destas 3 cepas. Estas duas medições foram utilizadas de modo a se avaliar a resistência algal ao ciclo de congelamento/descongelamento (0h – Figura 2A), bem como a recuperação do crescimento algal após o descongelamento (24h – Figura 2B), uma vez que alguns agentes crioprotetores podem se mostrar tóxicos para certas espécies algais. Observou-se maior viabilidade celular das cepas Embrapa|LBA##35 *Desmodesmus* sp. e Embrapa|#LBA#40 *C. biconvexa* quando estas foram congeladas na presença dos agentes crioprotetores glicerol e PEG400. Para a cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 embora não tenha sido observado

efeito crioprotetor significativo no tempo 0h (Figura 2A), este foi significativo para DMSO e glicerol em 24h após o descongelamento (Figura 2B).



**Figura 2.** Triagem de agentes crioprotetores. As células algais foram congeladas após 9 dias de cultivo na presença de glicerol, DMSO e PEG 400 em concentração 10% (v/v). A viabilidade celular das cepas foi medida A) 0h B) 24h após o descongelamento. Os resultados foram expressos em relação ao congelamento efetuado sem adição de agentes crioprotetores. Diferentes letras minúsculas na parte superior das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os agentes crioprotetores para a mesma estirpe de acordo com o teste de Tukey.

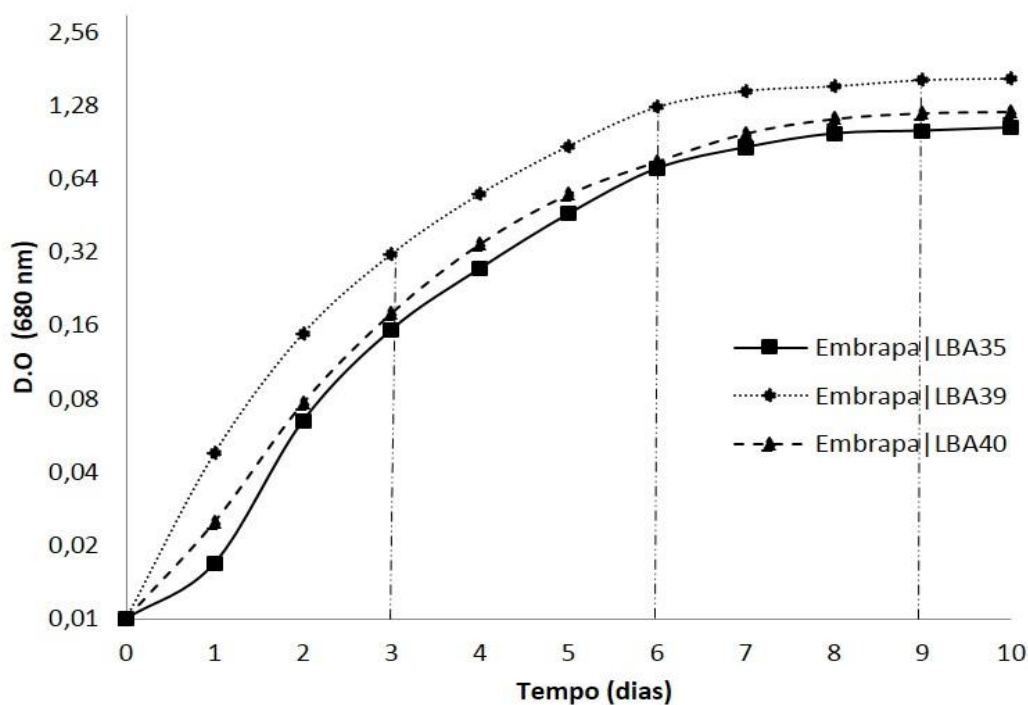
A eficiência dos agentes variou de acordo com a cepa avaliada (Figura 2). Nakazawa & Nishii (2012) e Joseph et al. (2000) também observaram eficácias variáveis de diferentes ACPs de acordo com as espécies estudadas. Para *Desmodesmus* sp. Embrapa|LBA#35 os melhores resultados foram obtidos com o congelamento em presença dos agentes glicerol e PEG 400, enquanto o DMSO pareceu produzir efeito nocivo à cepa. Este resultado está de acordo com o obtido por Bui et al. (2013), os quais testaram a capacidade crioprotetora do DMSO para quatro cepas pertencentes à família *Scenedesmaceae* e obtiveram baixos níveis de viabilidade em 2 das cepas, enquanto para as 2 cepas restantes o DMSO se mostrou tóxico e não foi possível recuperar células viáveis após o descongelamento.

A cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 apresentou maior viabilidade pós-congelamento (Figura 2B) quando as células foram submetidas ao processo de criopreservação na presença de DMSO e glicerol. Este resultado contrasta com o encontrado por Nakanishi et al. (2012), que ao examinarem a eficácia do DMSO e do glicerol em espécies de *Chlorella*, não observaram células sobreviventes. No entanto, é importante ressaltar que a concentração utilizada pelos autores variou entre 2,5-5%, de modo que o resultado negativo pode estar relacionado à concentração dos agentes e não à capacidade crioprotetora das substâncias.

De forma semelhante à cepa *Desmodesmus* sp. Embrapa|LBA#35, glicerol e PEG 400 foram os agentes que promoveram os melhores resultados de sobrevivência celular para a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40. Este resultado está de acordo com Crutchfield et al. (1999) e Yang & Li (2016), que apontaram o DMSO como agente ineficaz para criopreservação de cepas de *Chlamydomonas*.

### 3.2 Otimização da criopreservação algal

O metabolismo celular e a fase de crescimento algal podem influenciar a tolerância das células à criopreservação (CAÑAVATE & LUBIÁN, 1997; OSORIO et al., 2004; PIASEK et al., 2009; SALAS-LEIVA & DUPRÉ, 2011). Assim, foi analisado o padrão de crescimento celular das microalgas em cultivos fotoautotróficos aerados (Figura 3).



**Figura 3.** Curvas de crescimento baseadas em densidade óptica das cepas Embrapa|LBA#35 (*Desmodesmus sp.*); Embrapa|LBA#39 (*Chlorella sorokiniana*); Embrapa|LBA#40 (*Chlamydomonas biconvexa*) cultivadas em meio BG-11 por um período de 10 dias com iluminação artificial 16.000 Lux, fotoperíodo 12h:12h claro/escuro, temperatura de 30° C e aeração de 10L h<sup>-1</sup>.

Observa-se que as curvas de crescimento das três cepas apresentaram perfis semelhantes, embora a cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 tenha apresentado taxa de crescimento e rendimento celular ligeiramente maiores que as demais (Figura 3). De fato, a espécie *Chlorella sorokiniana* é reconhecida por apresentar altas taxas de divisão celular (PEQUENO, 2012). Foi observado que o crescimento algal teve início com divisão celular acelerada, configurando a fase de crescimento exponencial do início do cultivo até o 7º dia, a exceção da cepa *Desmodesmus sp.* Embrapa|LBA#35 que apresentou curta fase *lag* nas primeiras 24h de cultivo. A fase de desaceleração (terço final da fase exponencial) ocorreu do

5° ao 7° dia, e a fase estacionária foi registrada a partir do 8° dia de cultivo para todas as cepas. A literatura científica diverge quanto a fase ideal de congelamento de cepas de microalgas. Grandes coleções de algas (UTEX, CCAP, CCALA) recomendam que o congelamento seja feito durante a fase de crescimento exponencial. Em contrapartida, Cañavate & Lubián (1997) e Morschett et al. (2016) reportaram um aumento na criotolerância com a idade da cultura e melhores resultados para cepas de *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii* e *Chlorella vulgaris* em fase estacionária. Osorio et al. (2004), Piasek et al. (2009) e Salas-leiva & Dupré (2011) obtiveram êxito com experimentos realizados em uma fase de crescimento intermediária (fase de desaceleração).

Deste modo, a fim de se determinar as condições ótimas de criopreservação, as cepas foram submetidas ao DCCR (Tabela 2), utilizando os dois agentes crioprotetores mais eficientes para cada cepa (Figura 2), em três fases distintas do crescimento algal: Fase exponencial (3° dia de cultivo), fase de desaceleração (6° dia de cultivo) e fase estacionária (9° dia de cultivo). Os resultados de viabilidade celular pós-congelamento obtidos para cada cepa são apresentados na Tabela 3. Verificou-se que, para todas as respostas obtidas, os pontos centrais apresentam pouca variação, indicando uma boa repetibilidade do processo.

Por meio dos resultados obtidos, foram calculados os coeficientes de regressão da equação polinomial codificada de segunda ordem bem como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), de cada equação, para cada uma das cepas nas três fases distintas de crescimento (3°, 6° e 9° dia de cultivo) (Tabela 4). É possível verificar a existência de efeitos sinérgicos significativos ( $p < 0,05$ ) entre os agentes crioprotetores estudados.



**Tabela 3.** Taxas de viabilidade celular (%) das cepas *Desmodesmus sp.* Embrapa|LBA#35, *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40, obtidas para cada condição do DCCR (Tabela 2), 0h e 24h após o descongelamento.

Experimentos	Embrapa   LBA 35						Embrapa   LBA 39						Embrapa   LBA 40					
	3 dias		6 dias		9 dias		3 dias		6 dias		9 dias		3 dias		6 dias		9 dias	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h
1	3,90	3,53	0,85	0,87	1,03	1,40	6,58	7,60	22,11	31,98	12,07	22,80	9,03	8,20	13,19	13,08	24,20	16,47
2	7,22	33,08	0,65	0,88	1,77	13,88	16,56	44,36	31,98	105,59	18,27	52,74	25,04	26,71	40,63	44,49	54,44	47,72
3	6,58	31,97	0,62	0,91	1,55	12,62	4,31	5,67	31,12	34,12	18,27	28,79	27,86	28,39	45,35	46,74	60,15	52,43
4	6,16	5,48	0,59	0,86	1,44	2,18	4,54	16,68	28,54	31,55	17,79	23,63	9,81	9,30	14,58	14,69	25,54	19,16
5	4,42	3,11	0,78	0,91	0,92	1,14	5,22	7,37	23,39	26,61	12,88	18,32	5,23	6,76	6,00	11,69	19,16	10,75
6	6,43	30,02	0,75	0,90	2,29	8,49	6,01	7,83	28,11	29,83	13,48	19,28	19,44	12,76	30,88	17,37	44,36	34,95
7	4,69	4,42	0,65	0,97	1,37	1,59	13,27	39,60	33,05	78,76	21,10	43,49	5,00	6,38	5,68	11,26	18,48	9,41
8	6,32	30,08	0,78	0,87	1,85	8,60	11,69	12,25	29,83	34,55	14,80	29,57	21,94	15,06	36,24	22,30	45,70	35,62
9	20,70	49,62	0,85	0,97	2,18	18,93	15,43	35,97	37,34	72,54	28,76	39,27	31,24	39,33	57,57	71,94	46,38	50,07
10	20,75	49,62	0,85	0,97	2,10	18,78	15,20	36,08	38,42	72,75	28,31	39,74	31,17	39,23	57,68	71,51	46,04	50,74
11	19,33	49,46	0,85	0,97	2,18	18,86	14,86	35,40	37,34	73,61	28,28	39,74	30,92	39,28	56,93	71,94	46,04	49,74

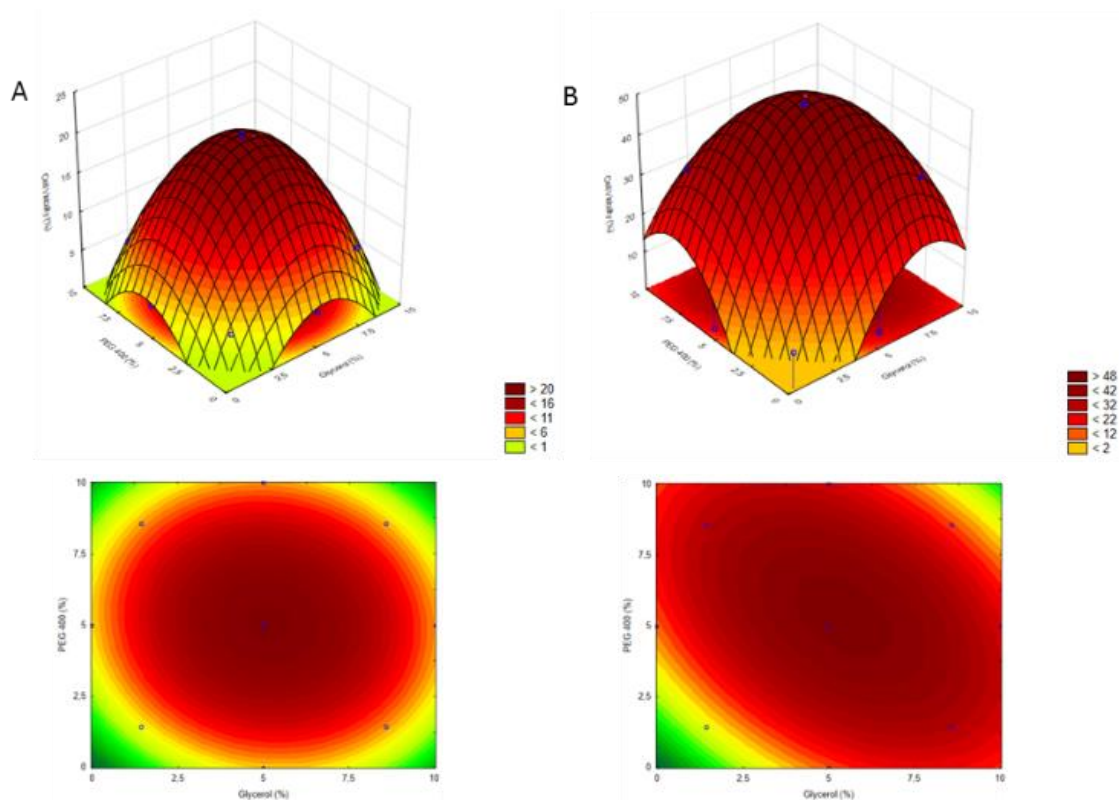
**Tabela 4.** Coeficientes de regressão de segunda ordem codificados para a viabilidade celular (%) das cepas *Desmodesmus sp.* Embrapa|LBA#35, *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 obtidas em 0h e 24h após o descongelamento. As células algais foram congeladas em três fases distintas do crescimento celular: Fase exponencial (3º dia de cultivo), fase de desaceleração (6º dia de cultivo) e fase estacionária (9º dia de cultivo).

Coeficientes	Viabilidade celular pós-congelamento (%)																	
	<i>Desmodesmus sp.</i> Embrapa LBA35						<i>C. sorokiniana</i> Embrapa LBA39						<i>C. biconvexa</i> Embrapa LBA40					
	3 dias		6 dias		9 dias		3 dias		6 dias		9 dias		3 dias		6 dias		9 dias	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h
$\beta_0$	0,03	0,21	0,01	0,01	0,01	0,11	0,02	0,06	0,01	0,07	0,02	0,01	0,04	0,06	0,14	0,15	0,02	0,03
$\beta_1$	0,01	NS	NS	NS	0,01	NS	NS	0,01	0,01	0,01	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\beta_2$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0,01	-0,02	NS	-0,02	NS	-0,003	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\beta_{11}$				-														
	-0,01	-0,07	NS	0,003	-0,01	-0,04	-0,01	NS	-0,02	-0,02	-0,01	-0,004	-0,012	-0,012	-0,04	-0,05	NS	-0,01
$\beta_{22}$	-0,01	-0,06	NS	NS	-0,01	-0,03	NS	-0,02	-0,01	NS	-0,01	NS	-0,011	-0,018	-0,03	-0,05	NS	-0,01
$\beta_{12}$	-0,01	-0,06	NS	NS	NS	-0,03	NS	NS	-0,01	-0,02	-0,01	-0,003	-0,013	-0,014	-0,03	0,03	-0,01	-0,01
$R^2$	0,99	0,81	0,60	0,73	0,74	0,87	0,65	0,76	0,95	0,87	0,86	0,82	0,73	0,90	0,77	0,92	0,49	0,49

Após a eliminação dos fatores não significativos (NS), foi realizada a análise de variância (ANOVA), e o teste F, a fim de verificar significância das regressões obtidas e possíveis faltas de ajuste dos modelos (dados não mostrados), a um nível de confiança de 95%.

Após a análise estatística dos dados, verificou-se que para a cepa *Desmodesmus sp.* Embrapa|LBA#35 as maiores taxas de recuperação de viabilidade celular pós-congelamento foram obtidas com o congelamento durante a fase de crescimento exponencial (3º dia de cultivo). Por outro lado, para as cepas *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 o congelamento efetuado no 6º dia de cultivo foi o que gerou as maiores taxas de recuperação de viabilidade celular.

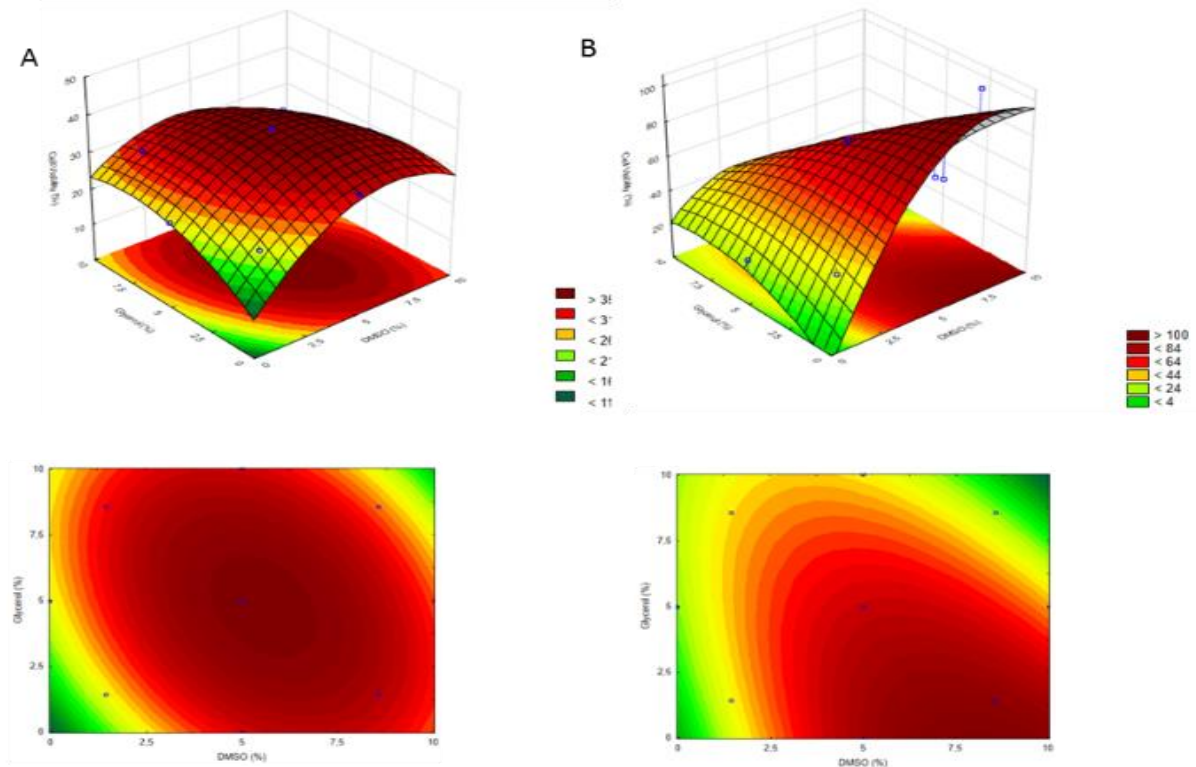
Na Figura 4 está a superfície de resposta e a curva de contorno para a viabilidade celular da cepa *Desmodesmus sp.* Embrapa|LBA#35 com o congelamento efetuado durante a fase de crescimento exponencial (3º dia de cultivo) e na presença de diferentes concentrações dos agentes glicerol e PEG 400.



**Figura 4.** Superfície de resposta e curvas de contorno da cepa *Desmodesmus* sp. Embrapa|LBA#35 a) 0h e b) 24h após o descongelamento.

A viabilidade celular variou de 3,9 a 20,75% e 3,11 a 49,62% para 0h e 24h pós-congelamento, respectivamente, e foi significativamente afetada tanto pela concentração de glicerol como pela concentração de PEG 400. As taxas de viabilidade aumentaram a medida que as condições experimentais se aproximaram do ponto central dos agentes, isto é, 5% de glicerol + 5% de PEG 400, onde a recuperação de células viáveis foi de aproximadamente 21% para o tempo de análise 0h e de 50% para 24h após o descongelamento.

Na Figura 5 está ilustrada a superfície de resposta e a curva de contorno nas diferentes concentrações dos agentes glicerol e DMSO sobre a viabilidade celular da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 com o congelamento efetuado no 6º dia de cultivo.

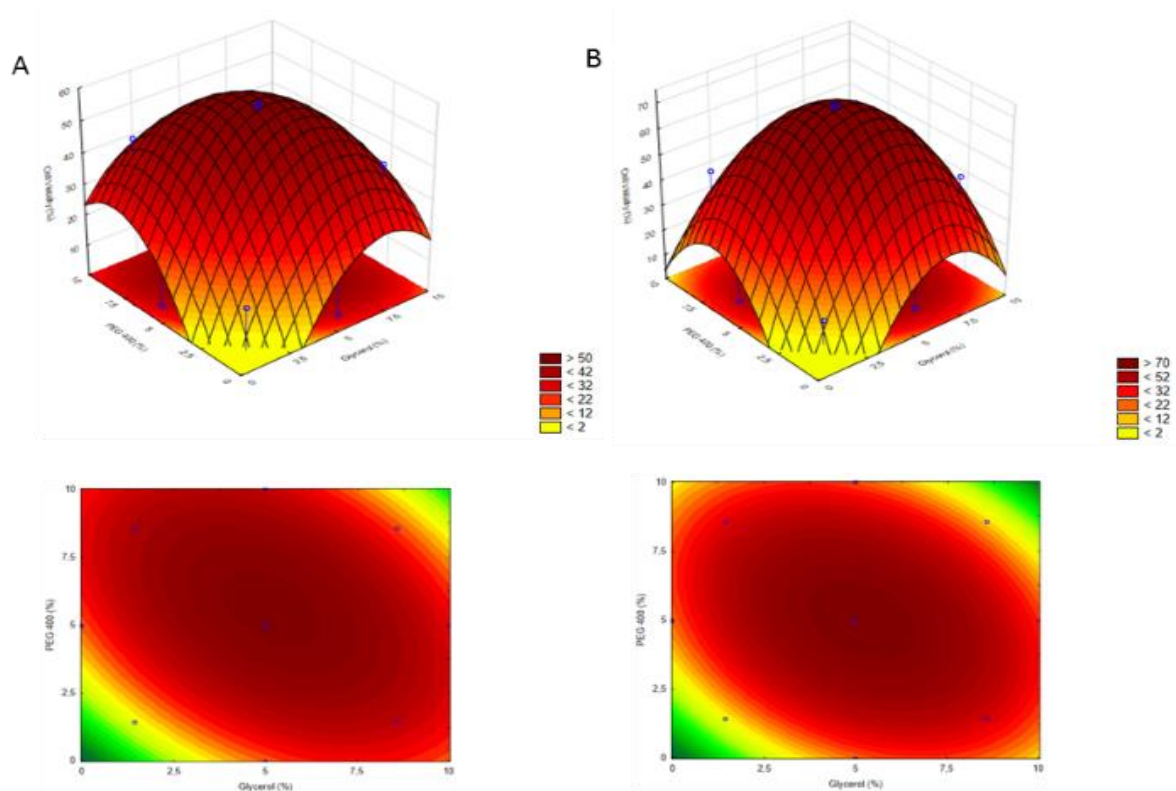


**Figura 5.** Superfície de resposta e curvas de contorno da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 a) 0h e b) 24h após o descongelamento.

A figura 5A evidencia que as melhores taxas de recuperação tendem a se concentrar em torno do ponto central. Entretanto, na figura 5B que corresponde a análise feita 24h após o descongelamento verifica-se que a variável glicerol produz efeito negativo sobre a viabilidade das células, pois verificou-se diminuição das taxas de recuperação com a elevação da concentração deste agente. Há uma tendência de faixa ótima para a recuperação de células viáveis da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 entre 6,7 a 9,7% de DMSO. Este resultado está de acordo com o encontrado por Morris (1976), que observou acréscimo na citotoxicidade para cepas de *Chlorella* em função do aumento da concentração de glicerol. Tzovenis et al. (2004) também reportaram a eficiência do DMSO na criopreservação de cepas de *Chlorella* ao testarem três ACPs (DMSO, metanol e propileno glicol), para as espécies *C. minutíssima* e *C. capsulata*. Os resultados observados para as duas espécies foram

semelhantes, tendo o DMSO promovido as maiores taxas de recuperação, enquanto as menores taxas foram obtidas com o congelamento em presença de metanol. Para *Chlorella minutissima* o DMSO promoveu uma recuperação de ~100%, enquanto a taxa de recuperação utilizando metanol ficou abaixo de 10%. *Chlorella capsulata* teve 60%, 40% e 30% de recuperação com o uso de DMSO, PG e metanol respectivamente. Guermazi et al. (2010), também comprovaram a eficácia do DMSO para a criopreservação de espécies de *Chlorella*.

Na Figura 6 está representada a superfície de resposta e a curva de contorno para a viabilidade celular da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 com o congelamento efetuado no 6º dia de cultivo na presença de diferentes concentrações dos agentes glicerol e PEG 400.



**Figura 6.** Superfície de resposta e curvas de contorno da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 a) 0h e b) 24h após o descongelamento.

De forma semelhante ao verificado para a cepa *Desmodesmus* sp. Embrapa|LBA#35, pode-se observar na Figura 6 que as condições centrais do delineamento, ou seja 5% glicerol + 5% PEG 400, conduzem a valores de viabilidade celular superiores para a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40. Nesta condição obteve-se taxa de viabilidade celular acima de 70%, 24h após o descongelamento.

A literatura científica exhibe diversos casos onde a combinação de diferentes agentes crioprotetores apresentou maior eficiência na recuperação de células, em comparação com a utilização destes separadamente (KONO et al., 1998; NAKANISHI et al., 2012; CHONG et al., 2016). Bui et al. (2013) avaliaram a recuperação de 19 cepas de microalgas congeladas apenas com DMSO, apenas com sacarose e em presença da combinação dos agentes. O efeito da sacarose como único crioprotetor foi testado em 6 das 19 cepas e proporcionou baixa viabilidade para três cepas (<10%), enquanto para as outras três não foram observadas células viáveis após o descongelamento. O DMSO teve um efeito crioprotetor significativamente maior (68% das cepas foram recuperadas e exibiram viabilidade de ~40%). A utilização combinada de sacarose e DMSO produziu uma melhoria tanto em termos do número de cepas recuperadas (100% de sucesso) como também para a viabilidade celular (~55%).

Nakanishi et al. (2012), ao examinarem a eficiência crioprotetora de DMSO, glicerol, e etileno glicol (EG) em cepas de *C. vulgaris*, *N. oculata* e *T. tetrahele*, observaram pouca ou nenhuma sobrevivência celular quando os agentes foram utilizados individualmente. No entanto, a mistura destes crioprotetores com sorbitol ou prolina produziu um efeito benéfico para todas as cepas. Os autores ainda relatam um aumento considerável na criopreservação quando o DMSO foi misturado com EG e prolina, com as taxas de sobrevivência de todas as cepas atingindo aproximadamente 50%. Chong et al. (2016), ao testarem o MeOH individualmente e com sacarose para examinar os efeitos da combinação de ACPs na

viabilidade pós-descongelamento de dinoflagelados, verificaram que a combinação de MeOH com sacarose aumentou a viabilidade celular.

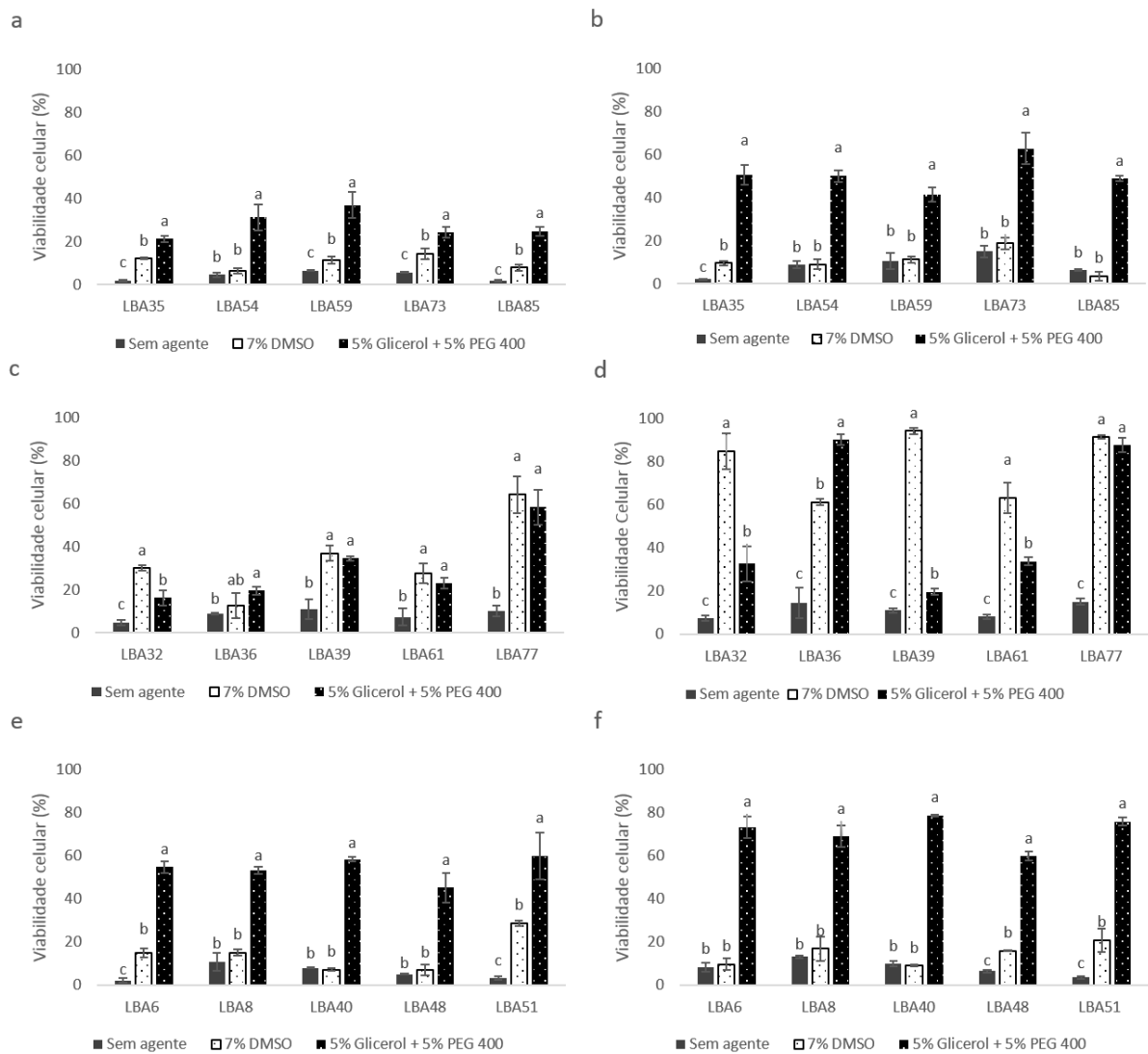
### 3.5 Validação das condições otimizadas de criopreservação

Observa-se, através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Figuras 4 a 6), a existência de uma região com elevado percentual de recuperação de viabilidade celular após congelamento/descongelamento. A indicação de uma faixa ótima é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma oscilação nas concentrações das variáveis estudadas, mantendo-se ainda o processo na condição otimizada (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

A condição selecionada, dentro da região ótima definida pelo modelo para a cepa *Desmodemus* sp. Embrapa|LBA#35 assim como para *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 foi 5% de glicerol + 5% de PEG 400. Já para a cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39, selecionou-se 7% (v/v) de DMSO como sendo a condição ótima, utilizando como critério para esta escolha a menor concentração de agente crioprotetor dentro na região de máxima viabilidade celular.

A validação experimental foi efetuada aplicando-se a 15 cepas (Tabela 1), (sendo 5 representantes cenobiais, 5 cocóides e 5 palmelóides), as condições ótimas de congelamento selecionadas (Figura 7).





**Figura 7.** Validação dos protocolos otimizados de criopreservação. As cepas algais indicadas foram congeladas após 3 (A-B) ou 6 (C-F) dias de cultivo na presença de DMSO 7% (v/v) (C-D) ou Glicerol 5% (v/v) + PEG400 5% (v/v) (A-B, E-F). A viabilidade celular das cepas foi medida 0h (a, c, e) e 24h (b, d, f) após o descongelamento. Diferentes letras minúsculas na parte superior das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com teste de Tukey.

As taxas de recuperação obtidas (Figura 7) foram próximas às encontradas nos experimentos de DCCR (item 3.4) para as cepas Embrapa|LBA#35, Embrapa|LBA#39 e

Embrapa|LBA#40, confirmando a reprodutibilidade do processo. Além disso, pode-se observar que há correlação entre a eficiência dos agentes crioprotetores e a morfologia do talo algal. Todas as cepas cenobiais e palmelóides apresentaram maiores taxas de recuperação celular na presença de Glicerol 5% (v/v) + PEG400 5% (v/v) (Figuras 7 A-B e E-F). Além disso, para 4 das 5 cepas cocóides analisadas o DMSO 7% apresentou efeito crioprotetor igual ou superior à combinação Glicerol 5% (v/v) + PEG400 5% (v/v). Apenas a cepa Embrapa|LBA#36 demonstrou melhor resultado quando criopreservada em presença desta combinação de agentes (Figura 7C-D).

Apesar de assumir morfologia unicelular cocóide quando cultivada em laboratório, esta cepa pertence ao gênero *Desmodesmus*, o que sugere que a origem filogenética também deva exercer influência significativa no sucesso da criopreservação.

#### 4. CONCLUSÕES

A idade da cultura influenciou a tolerância das células à criopreservação e a adequação dos resultados de viabilidade celular ao modelo proposto. Para a cepa *Desmodesmus* sp. Embrapa|LBA#35 (cenobial) a fase de crescimento exponencial mostrou-se ideal ao processo de criopreservação, enquanto para *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 (cocóide) e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 (palmelóide) a fase ideal ao congelamento ocorre durante a desaceleração do crescimento.

As composições crioprotetoras otimizadas por DCCR proporcionaram elevada recuperação de células viáveis pós-descongelamento em 15 cepas distintas de microalgas. Para as cepas cenobiais e palmelóides os melhores resultados foram obtidos com o congelamento na presença a combinação dos agentes glicerol e PEG 400. Já para a maior parte das cepas com morfologia cocóide o DMSO proporcionou maiores taxas de recuperação

da viabilidade celular. Os resultados indicam que tanto a estrutura do talo algal, como os agentes crioprotetores e a fase do crescimento algal são fatores significativos que impactam a eficiência da criopreservação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

D.S. Andrade, A. Colozzi Filho, Microalgas de águas continentais - Produção de Biomassa e Coprodutos. Londrina, IAPAR, 2014, pp. 21-24.

M.F.G, Rocha, D.T. Lima, R.S.N. Brilhante, R.A. Cordeiro, A.J. Monteiro, C.E.C. Teixeira, J.F. Ribeiro, D.S.C.M. Castelo-Branco, J.J.C. Sidrim, Glucose and lactose as cryoprotectants for fungal strains immobilised in sodium alginate: an emphasis on the conservation of the zygomycetes *Rhizopus* and *Mucor*, *Mycoses*, 56 (2012) 321-326.

A.F. Nascimento, A.C.S. Gonçalves, R.V. Reis Neto, M.C. Leal, A.T.M. Viveiros, Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*), *Animal Reproduction*, 9 (2012) 103-110.

Z. Hubálek, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, *Cryobiology*, 46 (2003) 205-229.

T.D.F. Aguiar, M.F.S. Teixeira, C.H.A. Teles, G.R. Martins, G. Rodrigues Júnior, E.C. Costa, Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores, *Acta Veterinaria Brasilica*, 6 (2012) 80-93.

R.A. Fleck, R.W. Pickup, J.G. Day, E.E. Benson, Characterisation of cryoinjury in *Euglena gracilis* using flow-cytometry and cryomicroscopy, *Cryobiology*, 52 (2006) 261–268.

A. Tannioua, V. Turpinb, T. Lebeau, Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen), *Cryobiology*, 65 (2012) 45–50.

J.P. Cañavate, L.M. Lubián, Effects of culture age on cryopreservation of marine microalgae, *European Journal of Phycology*, 32 (1997) 87-90.

T.V.L Bui, I.L. Ross, G. Jakob, B. Hankamer, Impact of Procedural Steps and Cryopreservation Agents in the Cryopreservation of Chlorophyte Microalgae, *Plos One*, 8 (2013) 1-9.  
vol. 8: 1-9, 2013.

S.I.I.A. Hadi, H. Santana, P.P.M. Brunale, T.G. Gomes, M.D. Oliveira, A. Matthiensen, M.E.C. Oliveira, F.C.P. Silva, B.S.A.F. Brasil, DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters, *Plos one*, 11 (2016) 1-18.

R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier, Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*, 111 (1979) 1-61.

A. P. L. Lima, E. S. B. Grosso, G. Ferreira, M. C. Andrade. Antimicrobial Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on Strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Isolated from Patients in a Teaching Hospital in Southern Minas Gerais. *Revista Ciências em Saúde*, 4 (2014) 55–63.

M. Catala, M. Esteban, G.J.L. Rodríguez, L.G. Quintanilla, Development of a naturally miniaturised testing method based on the mitochondrial activity of fern spores: A new higher plant bioassay, *Chemosphere*, 77 (2009) 983–988.

Statsoft Inc, *Statistica for Windows* [Computer program manual], Tulsa, OK: StatSoft Inc, 2007.

A. Nakazawa, I. Nishii, Amidic and acetonc cryoprotectants improve cryopreservation of volvocine green algae, *CryoLetters*, 33 (2012) 201-212.

I. Joseph, A. Panigrahi, P. Chandra, I. Kishore, Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectant dimethyl sulfoxide, methanol and glycerol, *Indian Journal of Marine Sciences*, 29 (2000) 243-247.

K. Nakanishi, K. Deuchi, K. Kuwano, Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage, *J. Appl. Phycol.*, 24 (2012) 1381–1385.

A. Crutchfield, K. Diller, J. Brand, Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), *European Journal of Phycology*, 34 (1999) 43-52.

D. Yang, W. Li, W. Methanol-promoted lipid remodelling during cooling sustains cryopreservation survival of *Chlamydomonas reinhardtii*, Plos One, 11 (2016) 1-17.

H.C. Osorio, C.N. Laranjeiro, L.M.A. Santos, M.F. Santos, First attempts to cryopreserve strains from the Coimbra Collection of Algae (ACOI) and the use of image analysis to assess viability, Nova Hedwigia, 79 (2004) 227–235.

B.P. Piasecki, K.R. Diller, J.J. Brand, Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: a cause of low viability at high cell density, Cryobiology, 58 (2009) 103–109.

J.S. Salas-Leiva, E. Dupré, Cryopreservation of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen): analysis of the effect of DMSO temperature and light regime during diferente equilibrium periods, Lat. Am. J. Aquat. Res., 39 (2011) 271-279.

M.A.G. Pequeno, D.D. Silva, A.T. Soares, K.K.B. Sassi, A.G. Souza, Avaliação do potencial do óleo da microalga cultivada *chlorella sp.* por cromatografia gasosa, Analytica, 10 (2012) 38-47.

H. Morschett, S. Reich, W. Wiechert, M. Oldiges, Simplified cryopreservation of the microalga *Chlorella vulgaris* integrating a novel concept for cell viability estimation, Engineering Life Sciences, 16 (2016) 36–44.

G.J. Morris, Cryopreservation of Chlorella. 1. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate, Archives of Microbiology, 107 (1976) 57-62.

I. Tzovenis, G. Triantaphyllidis, X. Naihong, E. Chatzinikolaou, E. Papadopoulou, G. Xouri, T. Tafas, Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain, *Aquaculture*, 230 (2004) 457–473.

W. Guerhazi, A. Sellami-Kammoun, J. Elloumi, Z. Drira, L. Aleya, R. Marangoni, I.H. Ayad, S. Maalej, Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile, *Journal of Thermal Biology*, 35 (2010) 175-181.

S. Kono, K. Kuwano, N. Saga, Cryopreservation of *Eisenia bicyclis* (Laminariales, Phaeophyta) in liquid nitrogen, *Journal Marine Biotech*, 6 (1998) 220–223.

G. Chong, S. Tsai, L.H. Wang, C.Y. Huang, C. Lin, Cryopreservation of the gorgonian endosymbiont Symbiodinium, *Scientific Reports*, 6 (2016) 52-59.

M.I. Rodrigues, A.F. Iemma, Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, Cárita Editora, 2nd edition, Campinas 2009, pp.135–232.