

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Marcela Celano Borsari

Análise do efeito do agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) visando melhorar a criopreservação de microalgas.

São Carlos, SP  
2022

Análise do efeito do agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) visando melhorar a criopreservação de microalgas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para graduação no curso de Biotecnologia.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Teresa Lombardi

Coorientador(a): Dr<sup>a</sup> Letícia Píton Tessarolli

São Carlos, SP

2022

## **AGRADECIMENTOS**

À 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.

À minha mãe, Simone Ferrazzi Celano, exemplo de amor, carinho, honestidade e perseverança, sua dedicação e apoio durante a minha graduação contribuíram para que eu chegasse até o final.

À minha avó, Leonildes Vaz Celano que contribuiu diretamente para a minha educação e formação do meu caráter.

À Prof. Dra Ana Teresa Lombardi, por ter aceitado ser minha orientadora, por toda contribuição no meu aprendizado e ter demonstrado tanta clareza e competência em seus ensinamentos.

À minha co-orientadora Dra. Letícia Piton Tessaroli, por sua disposição, por ter me ensinado e encorajado de diversas formas, bem como por não medir esforços para me ajudar.

À UFSCar, essencial no meu processo de formação como profissional.

Aos membros da banca examinadora estendo o profundo agradecimento.

## RESUMO

A criopreservação é uma técnica que agrega facilidade de manutenção de coleções e preservação genética das cepas, mas apresenta alta taxa de insucesso e problemas na reabilitação das cepas, sendo utilizado criopreservadores (CPA) como alcoóis, sorbitol e dimetilsulfóxido (DMSO) para inibir a formação de cristais de gelo dentro das células aumentando o sucesso do protocolo, mesmo considerando a toxicidade dessas substâncias. O objetivo do presente trabalho foi produzir um protocolo adaptado para o congelamento de espécies do gênero *Kirchneriella* utilizando DMSO tendo como base a resposta fisiológica das células. Para isso, *Kirchneriella lunaris* foi o organismo escolhido e verificou-se o impacto de diferentes concentrações (v/v) de DMSO e tempos de exposição na absorbância (570, 684 e 750 nm), densidade celular (células/mL) e rendimento fotossintético máximo. Inicialmente, realizou-se a curva de crescimento para determinar o ponto de maior concentração de biomassa e tempo de cultivo. A partir da determinação do tempo ótimo, iniciou-se os experimentos para validação de possíveis protocolos, por meio de teste de toxicidade em placas de 96 poços monitorado diariamente por absorbância para definir a amplitude de DMSO, sendo definidas as concentrações 0-20% do CPA escolhido. Prosseguiu-se para avaliação do crescimento e experimento de fotossíntese (PhytoPAM) sob efeito do DMSO. Os resultados demonstraram que o melhor protocolo se encontra na faixa de 5-10% (v/v) de DMSO, concentrações em que a microalga suporta a toxicidade do criopreservador e consegue retomar crescimento após o descongelamento. Concluiu-se que o protocolo de criopreservação com o uso do CPA DMSO 10% obteve melhores resultados no congelamento de cepas de *Kirchneriella lunaris* (CCMA-UFSCar 087, 123 e 443) e na retomada do crescimento. Esse resultado pode ser estendido para outras espécies do gênero *Kirchneriella*, mas nesse caso um estudo mais aprofundado deve ser realizado, pois possíveis limitações devem ser consideradas devido as diferenças morfológicas, fisiológicas e genéticas que são encontradas em diferentes espécies e alteram diretamente a eficiência do crioprotetor DMSO durante a criopreservação.

Palavras-chave: microalgas, *Kirchneriella lunares*, criopreservação, Dimetilsulfóxido

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** *Kirchneriella lunaris* (Kirchner) Moebius

**Figura 2.** Culturas de *Kirchneriella lunaris* em crescimento sob condições de cultivo controladas.

**Figura 3.** Curva de crescimento algal. Relação entre a intensidade da absorbância em escala logarítmica (Ln) e o tempo experimental (dias) para a alga *Kirchneriella lunaris*. Cada valor representa a média (n=3)). O coeficiente de variação obtido variou de 10 a 15%.

**Figura 4.** Curva de crescimento algal. Relação entre a intensidade da fluorescência e o tempo experimental (dias) para a alga *Kirchneriella lunaris*. Cada valor representa a média (n=3)). O coeficiente de variação obtido variou de 10 a 15%.

**Figura 5.** Curva de crescimento algal. Relação entre a densidade populacional (células/mL) e o tempo experimental (dias) para a alga *Kirchneriella lunaris*. Cada valor representa a média (n=3)). O coeficiente de variação obtido variou de 10 a 15%.

**Figura 6.** Rendimento fotossintético máximo mensurado durante o cultivo da microalga *Kirchneriella lunaris* em função do tempo (dias) para avaliação do potencial fotossintético.

**Figura 7.** Densidade óptica de cultivos sob diferentes concentrações de DMSO(v/v). **(a)** Densidade celular de *Kirchneriella lunaris* (células/ $\mu$ l) avaliadas em 1h. **(b)** Densidade celular de *Kirchneriella lunaris* (células/ $\mu$ l) avaliadas em 8h.

**Figura 8.** Densidade óptica de cultivos sob diferentes concentrações de DMSO (v/v) e períodos de análise de 0h, 24h e 48h.

**Figura 9.** O rendimento fotossintético máximo em função de diferentes concentrações de DMSO e tempo de exposição.

**Figura 10.** Rendimento efetivo em função de diferentes concentrações de DMSO e tempo de exposição

**Figura 11.** Teste de Viabilidade Celular Média das células de *Kirchneriella lunaris* após o descongelamento, considerando diferentes concentrações de DMSO (%).

**Figura 12.** Viabilidade celular pós-congelamento de diferentes espécies de *Kirchneriella*, congeladas utilizando o protocolo padrão (azul, DMSO 5%) e o protocolo adaptado segundo experimento realizado (laranja, DMSO 10%).

**Figura 13.** Fluorescência da clorofila-a (RFU - unidades arbitrárias) de diferentes espécies de *Kirchneriella* do protocolo adaptado (barra azul) em comparação com o protocolo de congelamento tradicional (barra laranja) de Tessaroli (2017).

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1 <i>Microalgas verdes, Filo Chlorophyta</i> .....	7
1.2. Monitoramento do crescimento celular .....	8
1.3. Criopreservação .....	9
1.3.1 Dimetilsulfóxido (DMSO) .....	11
1.4 Análises de Estado Fisiológico das Culturas: PhytoPAM - Fluorescência de amplitude modulada (PAM) .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 Objetivo Geral .....	12
2.2 Objetivos Específicos .....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1. Cepas de microalgas.....	13
3.1.1 Condições de culturas das microalgas.....	14
3.2. Curvas de Crescimento e Análise de estado fisiológico.....	14
3.3. Testes de toxicidade do DMSO.....	15
3.4. Análises realizadas para desenvolvimento do protocolo.....	16
3.5. Protocolo tradicional e adaptado.....	18
3.6 Análise estatística.....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 Curvas de crescimento.....	20
4.2 Experimento toxicidade.....	22
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As algas são organismos eucarióticos fotossintetizantes e fundamentais para a manutenção da vida na Terra devido à sua capacidade de fornecer uma grande quantidade de oxigênio para a atmosfera. Elas possuem uma grande variedade em relação à sua morfologia, tipo de reprodução, fisiologia e ecologia, possibilitando assim a apresentação de metabolismos capazes de se adaptar aos mais diferentes ambientes (ANGELO et al., 2015).

As microalgas relevantes para a biotecnologia são as algas verdes, algumas já utilizadas e comercializadas (PRIYADARSHANI; RATH, 2012). As aplicações dos seus produtos vão desde alimentos saudáveis para consumo humano, aquicultura, ração animal, até agentes corantes, cosméticos, fármacos, biocombustíveis e outros materiais que contribuem para melhorar e garantir uma maior praticidade à vida do ser humano (DERNER et al., 2006).

### **1.1 Microalgas verdes, Filo Chlorophyta**

As microalgas são microrganismos eucarióticos fotossintetizantes capazes de se adaptar aos mais diversos ambientes (ANGELO et al., 2015). As algas verdes pertencem ao grupo de algas mais relacionado com as plantas terrestres e possuem grande importância ecológica, uma vez que são constituintes do fitoplâncton e um dos principais produtores na cadeia trófica, além de também serem utilizadas como bioindicadoras da qualidade da água. Chlorophyceae é uma das classes de algas verdes conhecida por sua grande variedade de morfologia vegetativa e variedade de habitats, podendo ser encontradas também em fontes de água doce a salina, condições árticas, terrestres, aéreas até nascentes termais (NORTON, 1996; BUI et al., 2013). Essa biodiversidade garante às algas capacidades únicas como alta produtividade de crescimento, realizar fixação de CO<sub>2</sub>, necessidades de baixas demandas nutricionais e capacidades de sintetizar uma vasta gama de produtos tais como proteínas, lípidos, hidratos de carbono, carotenóides ou vitaminas que possuem atualmente muitas utilidades no aspecto econômico e comercial (MORSCHET et al., 2016).

As microalgas verdes pertencem ao filo Chlorophyta e tem como características principais a presença de celulose na parede celular, amido como material de reserva, clorofila a e b, além de serem seres unicelulares ou multicelulares (TORTORA et al.,

2006). As microalgas incluindo as espécies de Chlorophyta possuem como principal função a realização de fotossíntese e são frequentemente encontradas em ambientes aquáticos com luz abundante (águas rasas e piscinas de marés), bem como em ambientes terrestres úmidos, nas superfícies de rochas e árvores (KENNEDY, 2020). Em cadeias alimentares aquáticas, as algas verdes atuam como produtoras primárias e podem estabelecer relação de simbiose com diversos outros organismos, como fungos, moluscos e cnidários. Em função dessas características, essas microalgas possuem uma grande importância ecológica (LELIAERT et al., 2012).

A família Selenastraceae pertence ao Filo Chlorophyta e compreende algas verdes cocóides com formato alongado (ou fusiforme), lunado ou espiralado. As células vivas solitárias ou coloniais são fusiformes ou cilíndricas com extremidades afiladas ou arredondadas. A forma da célula é reta, em forma de foice ou curvada em espiral (KRIENITZ et al., 2001). O principal critério para definir as Selenastraceae como uma família distinta é seu modo especial de divisão celular e formação de autósporos, sendo que essa família foi definida pela primeira vez por Blackman e Tansley em 1903 e, desde então, vem sofrendo modificações de acordo com estudos filogenéticos e novas descobertas.

Nesse grupo se incluem os gêneros *Ankistrodesmus*, *Kirchneriella*, *Quadrigula* e *Selenastrum*, no entanto o conhecimento atual acerca da identificação e taxonomia dessa família ainda é pouco compreendido em todo o mundo (KRIENITZ et al., 2001; FAWLEY et al. 2006). De acordo com a plataforma AlgaeBase, o gênero *Kirchneriella* possui cerca de 41 espécies distintas identificadas até o momento.

## **1.2 Monitoramento do crescimento celular**

Em um cultivo descontínuo de microalgas, o tempo de crescimento pode variar de acordo com as condições impostas, sendo que o acompanhamento do desenvolvimento celular se faz essencial para determinar o momento ótimo para coleta da biomassa formada. Os principais métodos utilizados para acompanhar o crescimento celular é a contagem de células por microscopia e a medida da densidade óptica por espectrofotometria (LOURENÇO, 2006).

A contagem direta por microscopia é a técnica mais simples e tradicional para monitorar o crescimento de microalgas, por intermédio de uma câmara de contagem, como por exemplo, uma câmara de Neubauer, um número de células algais presentes

em um determinado volume é contado com o auxílio de um microscópio ótico com capacidade de aumento de pelo menos 400 vezes. Nas contagens em microscópio, a densidade de indivíduos é geralmente expressa como o número de células por mililitro de cultivo (LOURENÇO, 2006).

O crescimento de microalgas pelo uso da densidade óptica se baseia na obstrução física da luz pelas células, quanto mais células estiverem presentes na amostra maior será a absorção de luz e menor será a passagem da luz pela amostra. Utiliza-se um espectrofotômetro para realizar as medições de um cultivo de microalgas num comprimento de onda de 690 nm (LOURENÇO, 2006).

### **1.3. Criopreservação**

A criopreservação vem se destacando com o objetivo de facilitar a manutenção de culturas de algas (ANDRADE, 2014). No entanto, muitos são os aspectos capazes de afetar as taxas de sucesso do protocolo. Em função das diferentes necessidades específicas de grupos de microalgas, mesmo em espécies muito próximas geneticamente ou morfológicamente, algumas características como fase de crescimento, tamanho, formato celular, composição do meio de crescimento e o teor de água podem dificultar o estabelecimento de um protocolo universal (TAYLOR & FLETCHER, 1998; RHODES et al., 2006; DAY & HARDING, 2007; KIM et al, 2017). Assim, a determinação dos protocolos para aplicação em grupos de organismos exige atenção para detalhes das culturas a serem preservadas, que podem ser determinantes para o sucesso ou fracasso da metodologia (BUI et al, 2013).

O metabolismo celular e a fase de crescimento algal podem influenciar a tolerância das células à criopreservação (CAÑAVATE; LUBIÁN, 1997; OSORIO et al., 2004; SALAS-LEIVA & DUPRÉ, 2011). Organismos com tamanho reduzido e simplicidade morfológica geralmente apresentam melhores resultados à etapa inicial de congelamento, restringindo as chances de ocorrerem danos celulares (DAY; BRAND, 2005).

Tendo em vista todo o potencial para exploração biotecnológica das algas, tornou-se essencial a manutenção desses organismos em culturas para padronização dos inóculos e facilidade de acesso aos organismos (HIPKIN et al., 2013). A manutenção de coleções de algas em meio de cultura líquidos ou semi-sólidos à base de ágar, embora bem estabelecidos, possuem baixa estabilidade, são trabalhosas,

dispendiosas e sujeitas à contaminação e mudanças genéticas (DAY; MCLLELAN, 2007).

Buscou-se então reduzir os custos do regime de manutenção das culturas, por meio da criação de bancos criopreservados. Os bancos de armazenamento congelados permitem a manutenção em longo prazo desses organismos em questão, minimizando os gastos com manuseio do material, visto que as culturas congeladas, em teoria, podem ser mantidas por prazos indeterminados, e ainda possuem a vantagem de apresentarem estabilidade em relação às suas características biológicas, além da disponibilidade de estirpes para cultura, utilização otimizada de espaço e materiais (KUWANO et al., 2004; TESSAROLLI et al., 2017).

O processo de criopreservação é usualmente realizado, para microalgas, com a utilização de um protocolo em duas etapas: (I) Após o tratamento da alga com o agente crioprotetor (CPA), para proteção celular, é realizado o resfriamento em taxa controlada ( $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) até uma temperatura intermediária ( $-40^{\circ}\text{C}$ ), que é a temperatura de formação de gelo homogêneo (Day & Brand 2005). (II) Em seguida, as amostras são imersas diretamente em nitrogênio líquido para finalizar o resfriamento até a temperatura em que todas as reações químicas intracelulares estão paralisadas. As amostras são armazenadas imersas em nitrogênio líquido, o que deve lhes conferir a manutenção de sua viabilidade por tempo indeterminado (Day & Brand 2005). A recuperação das amostras criopreservadas também é um passo crucial para a recuperação das culturas e deve ser realizada de forma controlada para garantir a manutenção da viabilidade (DAY & BRAND 2005; TESSAROLLI, 2017).

Durante o processo de congelamento, são utilizados agentes crioprotetores (CPAs), substâncias que proporcionam a proteção celular e tecidual durante a redução da temperatura, agindo para facilitar o balanço no processo de perda de água pelas células e evitando a formação de cristais de gelo intracelulares, que podem ser letais para as células (DAY; FLECK, 2015).

Essas substâncias podem ser classificadas em penetrantes e não penetrantes, variando de acordo com a sua capacidade de atravessar a membrana plasmática (CASTRO *et al*, 2011). Crioprotetores penetrantes são substâncias químicas capazes de penetrar na membrana das células causando alterações na permeabilidade celular e diminuindo a temperatura na qual a solução intracelular congela, impedindo assim a formação de cristais de gelo intracelulares (CARNEIRO, 2007; WOWK, 2017). São representantes desse grupo o metanol (MeOH), o dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol

(CARNEIRO, 2007), sendo estes os CPAs mais usualmente aplicados para microalgas. Por outro lado, embora os crioprotetores não penetrantes sejam menos tóxicos para a célula, eles são menos utilizados nos protocolos mais usuais de criopreservação. Esse tipo de crioprotetor causa desidratação celular, reduzindo assim a quantidade de água disponível para formar gelo intracelular. São exemplos desta categoria a polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG). Embora os CPAs sejam absolutamente necessários e amplamente utilizados nos protocolos de criopreservação, para esta função frequentemente são usados compostos tóxicos para culturas de microalgas, que podem causar danos celulares irreversíveis ou até resultar em morte celular.

### **1.3.1. Dimetilsulfóxido (DMSO)**

Em laboratórios de cultivo celular, o DMSO é usado como crioprotetor de células, uma vez que a adição dessa substância diminui o volume de água para formação de cristais de gelo. Dessa forma, ao substituir a água nas células em função do seu poder de penetrabilidade e difusão pela membrana lipídica, esse crioprotetor também diminui o grau de desidratação celular (DE VRIES et al., 2004; RAWLS et al., 2016). Por ser um álcool dipolar, é capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração das moléculas. Esse crioprotetor interage com as membranas celulares, atravessando-as rapidamente por meio de difusão (CASTRO et al., 2011). O DMSO é uma substância tóxica, no entanto sua toxicidade pode variar de acordo com a molécula ou composto em que é submetido.

A adição do DMSO intracelular à solução de congelamento é essencial, mas não garante o sucesso do protocolo de criopreservação, devido ao seu efeito tóxico, que para ser bem sucedido requer um perfeito equilíbrio entre a concentração do crioprotetor, a temperatura e o tempo de exposição à estrutura que será criopreservada (CASTRO et al., 2011). Concentrações acima de 20% de DMSO são consideradas tóxicas para as células. Na literatura, a diminuição da viabilidade celular tem sido associada aos danos celulares resultantes da criopreservação em congelamentos excessivamente lentos por meio da formação de cristais de gelo consequentes de uma hiperosmolaridade extracelular.

Um aspecto chave do mecanismo de ação do DMSO é a formação de poros na membrana celular, o que ocasiona dano e inviabiliza a célula. Dessa forma,

recomenda-se a utilização de concentrações menores que 10% para o congelamento celular (MASSUMOTO; MIZUKAMI, 2000). Esses dados sugerem que para minimizar os efeitos tóxicos do DMSO, visando um equilíbrio entre proteção e toxicidade para a aplicação desse composto na criopreservação, é necessário determinar a melhor concentração vs. tempo de exposição do DMSO nas células de interesse. A determinação do sucesso do protocolo de congelamento para determinada espécie é realizada por meio de análise da viabilidade da cultura e sua capacidade de gerar nova cultura semelhante à original. Análises quantitativas da viabilidade envolvem técnicas para identificar células vivas, ou seja, células que apresentam um metabolismo ativo e diferenciá-las das células que foram danificadas durante o processo de congelamento.

#### **1.4. Análises de Estado Fisiológico das Culturas: PhytoPAM - Fluorescência de amplitude modulada (PAM)**

Tendo em vista que o comportamento fisiológico das microalgas exige uma avaliação precisa, o PhytoPAM é o método utilizado para detectar o estresse e a susceptibilidade das cepas ao crioprotetor, o que possibilita a determinação de um estado ótimo da cultura para o congelamento (melhor potencial fotossintético), visto que as culturas mais robustas tendem a obter mais sucesso que as culturas sob estresse. A fluorescência de amplitude modulada (PAM) é uma ferramenta que tem como função principal promover o monitoramento da fluorescência de clorofila em algas para estimar alterações na atividade fotossintética (FUJISAWA et al., 2019). A fluorescência da clorofila, além de não-destrutiva, é altamente sensível e de fácil manuseio, permitindo a obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre a condição fisiológica do aparato celular.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo principal, compreender e estabelecer um protocolo adaptado para a criopreservação de microalgas verdes, utilizando uma espécie do gênero *Kirchneriella*, *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 87), SCHMIDLE, W. 1893.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer, através de curva de crescimento acompanhada de análise fisiológica da cepa, o estado “ótimo” fotossintético da cultura (momento de melhor efetividade da fotossíntese) que será utilizado posteriormente nas análises de toxicidade.
- Determinar e analisar a toxicidade do agente crioprotetor com alta permeabilidade celular, o Dimetilsulfóxido (DMSO), em espécies de *Kirchneriella lunaris* (CCMA - UFSCar 87), em curto prazo, simulando atividade desse agente durante o processo de congelamento.
- Determinar o protocolo adaptado para a criopreservação de cepas da espécie estudada, de acordo com os resultados obtidos na análise de toxicidade.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Cepas de Microalgas

Foram selecionados para a realização dos experimentos e no melhoramento do protocolo algas de gênero *Kirchneriella*. Análises de toxicidade do CPA foram realizadas em culturas da espécie *Kirchneriella lunaris* (CCMA-UFSCar 87) cedida da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce (CCMA – UFSCAR), mantidas no Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (Brasil). Posteriormente, foram realizadas análises de extrapolação do protocolo adaptado para outras cepas e espécies do gênero *Kirchneriella*: *K lunaris*. (Kirchner) Möbius (CCMA-UFSCar 87, CCMA-UFSCar 123, CCMA-UFSCar 443), *K. obesa*. (West) West & West (CCMA-UFSCar 345, CCMA-UFSCar 516, CCMA-UFSCar CB12-37), *K. pseudoaperta* Komárek (CCMA-UFSCar 346), *K. aperta* Teiling (CCMA-UFSCar 482).. As culturas para desenvolvimento desse trabalho foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Inessa Lacativa Bagatini, do Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, UFSCar.



Figura 1: *Kirchneriella lunaris* (Kirchner) Moebius

Fonte: Protist Information Serve - Illustrations of The Japanese Fresh-water Algae, 1977.

### 3.1.1 Condições de culturas das microalgas

A microalga utilizada no cultivo foi *Kirchneriella lunaris*, sendo esta selecionada por apresentar um crescimento rápido e robusto, bem explorado na literatura (WILDE et al., 2006; ZHAO et al., 2014). As culturas experimentais foram montadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen 1972). Para estabelecimento das culturas foram utilizados volumes de inóculo para obtenção de densidade celular inicial de  $5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  em fase de crescimento exponencial. As culturas eram iluminadas com LED e mantidas sob condições controladas de temperatura ( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ ), luminosidade ( $130 \text{ } \mu\text{mol photons m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo sendo mantidas 12h no claro e 12h no escuro.



Figura 2. Culturas de *Kirchneriella lunaris* em crescimento sob condições de cultivo controladas

### **3.2. Curvas de Crescimento e Análise de estado fisiológico**

Os experimentos de análise do crescimento das culturas de *K. lunaris* foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Algas da UFSCar – LALGAS.

Os cultivos tiveram a duração de 16 dias, alíquotas de 15 mL foram recolhidas diariamente, em condições assépticas, para monitoramento do crescimento celular através da medição de fluorescência *in vivo*, em unidades relativas (RFU), em um fluorímetro digital (Turner Designs, Trilogy, USA), a contagem de células foi realizada por microscopia óptica através do hemocitômetro, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro em comprimentos de onda de 570, 684 e 750 nm e a avaliação dos parâmetros fotossintéticos, medidos por meio de um fluorímetro de amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM, Heinz Walz GmbH, Germany) em temperatura ambiente.

A partir dos dados obtidos pelas análises microscópicas, fluorométricas e espectrofotométricas de cada solução, foi possível plotar a curva analítica relacionando a absorbância x tempo, contagem celular x tempo e a fluorescência x tempo para determinar o melhor dia de crescimento resultando no melhor estado fisiológico da alga (AMARAL,2014).

### **3.3. Testes de toxicidade do DMSO**

Foram realizados dois diferentes testes para identificar como a microalga respondia à exposição a diferentes concentrações do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO).

#### **Teste em placas – Definição de concentrações de DMSO**

Inicialmente, foi realizado um teste rápido, com uma maior diversidade de concentrações de DMSO, permitindo verificar mais facilmente os limites de sobrevivência das células expostas às diferentes concentrações de DMSO.

Este teste foi realizado em uma placa com 96 poços, onde foram analisadas as respostas da cultura de microalgas, com densidade inicial de  $5 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup>, a concentrações de DMSO entre 0 e 50% (v/v) com incrementos de 2,5% entre as amostras, em triplicatas. Foram preparadas soluções com diferentes concentrações

de DMSO entre 0 e 50% (v/v), em incrementos de 2,5%, sendo estas diluídas em meio WC (Guillard e Lorenzen, 1972) e previamente esterilizadas por filtração em membrana 0,2  $\mu\text{m}$ .

As soluções de DMSO foram distribuídas de forma crescente de concentração em placa de 96 poços, em triplicatas. Também foram estabelecidas condições controle para as análises, com preenchimento de poços com meio de cultura; água deionizada e solução de DMSO (100%). Em seguida foi adicionado 0.15 microlitros de cultura concentrada de *K. lunaris* em cada poço da placa, obtendo-se concentração final de  $5 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup>.

Para obtenção da biomassa algal em concentração necessária para aplicação no desenho experimental, que determinava adição de um volume pequeno e conhecido de cultura de *K. lunaris* de maneira a obter concentração final após mistura de  $5 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup>, culturas de *K. lunaris* nas condições ideais estabelecidas anteriormente foram concentradas por centrifugação, em condições assépticas.

As placas foram inseridas na leitora automática de absorvância e foram realizadas leituras nos comprimentos de onda 570 nm, 684 nm e 750 nm, (MARCA: BIOTEK MODELO: 800TS).

De acordo com os resultados obtidos na análise de placas foram determinadas as concentrações de DMSO representativas dos limites de toxicidade para as culturas de *K. lunaris*. Essas concentrações foram utilizadas para análises mais avançadas utilizando-se o espectrofotômetro e a eficiência do aparato fotossintético, no PhytoPAM (Heinz Walz - Alemanha).

### **3.4 Análises realizadas para desenvolvimento do protocolo**

#### **Eficiência Fotossintética**

Por meio da aferição das amostras com as diferentes concentrações 0- 20% (v/v) DMSO no PhytoPAM foi possível ter acesso a três variáveis, o rendimento máximo, rendimento efetivo e Fluorescência da Clorofila-a.

A eficiência fotossintética e os parâmetros relacionados do comportamento fotossintético de *K. lunaris* foram determinados em um fluorímetro Phyto PAM (Heinz Walz - Alemanha). Esse método quantifica a emissão de fluorescência e a relaciona com a fotossíntese. Neste aparelho o rendimento fotossintético máximo ( $\Phi\text{M}$ ) foi utilizado como indicador na saúde algal, e o rendimento efetivo foi obtido após

exposição a luz actínica (Kromkamp e Forster, 2003). Para isso, as amostras ficaram no escuro por 20 minutos, para oxidação completa do fotossistema II (PSII). Esse parâmetro resulta da diferença entre a fluorescência máxima e mínima dividida pela fluorescência máxima (1) após a alga ser aclimatada no escuro. Os detalhes da metodologia podem ser encontrados em LOMBARDI & MALDONADO (2011).

$$\Phi M = (FM - FO) / FM \quad (1)$$

Ao final da fase exponencial foram determinados os valores de rendimento quântico efetivo ( $\Phi'M$ ), a dissipação fotoquímica (qP) e não fotoquímica (NPQ) com pulsos de luz semelhante à do cultivo ( $130 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (JUNEAU, BERDEY & POPOVIC 2002).

#### **Preparo das soluções com diferentes concentrações de DMSO**

As 3 réplicas eram montadas no dia anterior, enquanto as diferentes concentrações de incrementos de 2,5%, do crioprotetor DMSO eram inseridas no momento da aferição. As réplicas estavam diluídas em meio WC (Guillard e Lorenzen, 1972) e previamente esterilizadas por filtração em membrana 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### **Preparo das culturas (obtenção da biomassa).**

Para obtenção da biomassa algal em concentração necessária para aplicação no desenho experimental, que determinava adição de um volume pequeno e conhecido de cultura de *K. lunaris* de maneira a obter concentração final após mistura de  $5 \times 10^4$  células. $\text{ml}^{-1}$ , culturas de *K. lunaris* nas condições ideais estabelecidas anteriormente foram concentradas por centrifugação, em condições assépticas.

#### **Montagem do Experimento**

Para a montagem do experimento, inicialmente as células eram mantidas no escuro por pelo menos 20 minutos antes do início das leituras no aparelho para oxidação completa do fotossistema II. Em seguida, eram inseridas diferentes concentrações de DMSO e aferidas imediatamente no PhytoPAM para uma melhor execução dos resultados. Durante todo o percurso do experimento as culturas foram

mantidas no escuro, evitando qualquer tipo de interferência nas análises de PhytoPAM e fluorescência.

### **Tempo de exposição**

As amostras com as diferentes concentrações do crioprotetor foram aferidas inicialmente a cada 5 min, durante a primeira hora, em seguida foram estabelecidos maiores prazos de tempo, devido à uma notável queda do rendimento fotossintético máximo, após 1 hora de exposição sob condições maiores que 10%(v/v) DMSO. O prazo de tempo se estendeu por 48 horas para averiguar a eficiência da fotossíntese (em curto prazo) das culturas expostas ao composto.

### **Medidas de controle do estado fisiológico das células durante o experimento**

Durante o dia eram realizados pelo menos 3 medidas de rendimento quântico máximo das células imediatamente após diluição em meio de cultura, nas mesmas condições experimentais verificadas com o DMSO.

### **Densidade óptica em espectrofotômetro**

A toxicidade do DMSO também foi acessada de forma indireta através da observação da absorbância e fluorescência da clorofila-a. A fluorescência da clorofila-a é uma técnica precisa e não destrutiva de análise da eficiência fotossintética (BAKER,2008). Esta análise permitiu a percepção de mudanças no estado fisiológico da alga através da realização de leituras das densidades ópticas das réplicas com as diferentes concentrações de DMSO 0 - 20% (v/v) sendo acessados em três comprimentos de onda definidos (570, 684 e 750 nm) no espectrofotômetro NANOCOLOR UV/Vis (Macherey-Nagel, EUA).

## **3.5. Teste do protocolo tradicional e do adaptado**

### **Metodologia do protocolo tradicional e adaptado**

Após realizado os experimentos e analisado os gráficos foi sugerida uma adaptação do protocolo. Para validação do protocolo melhorado sugerido, foi realizada uma comparação direta dos resultados obtidos pelo protocolo tradicional aplicado na

CCMA-UFSCar (TESSAROLLI *et al.* 2017) e o protocolo adaptado, utilizando-se como CPA a solução de DMSO em concentração final de 10% (v/v).

### **Validação do protocolo adaptado sugerido.**

O protocolo adaptado foi realizado através dos dados obtidos pelo protocolo (TESSAROLLI *et al.* 2017), em que consistia no estudo de cepas microalga *Selenastrum bibrainum* e algumas espécies de *Kirchneriella* submetidas ao crioprotetor DMSO 5%(v/v), no entanto o protocolo apresentou viabilidade intermediária, ou inferior quando as microalgas foram submetidos a esta concentração de crioprotetor após o descongelamento.

Deste modo o protocolo adaptado realizou o estudo e aprimoramento para a espécie de *K. lunaris* utilizando o crioprotetor DMSO à 10%(v/v). Para comprovar a validação do protocolo adaptado foi realizado uma etapa de descongelamento para 8 diferentes cepas de *Kirchneriella lunaris*: *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 87), *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 123), *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 443), *K. obesa* (CCMA-UFSCar 345), *K. pseudoaperta* (CCMA-UFSCar 346), *K. aperta* (CCMA-UFSCar 482), *K. obesa* (CCMA-UFSCar 516) e *K. obesa* (CCMA-UFSCar CB12-37) (figura11).

Com a utilização do protocolo adaptado para o congelamento de diferentes espécies de *Kirchneriella*, foi possível observar um aumento de até 96% na viabilidade pós-congelamento, com resultados mais expressivos observados nas linhagens de *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 087, 123 e 443). Esse resultado é expressivo, porém, como observado para outras espécies do gênero *Kirchneriella*, mais testes são necessários para expansão do protocolo para outros grupos.

A avaliação da viabilidade dos testes utilizando DMSO como CPA para amostras de *K. lunaris* e comparação da eficácia de diferentes concentrações de criopreservante foi realizada por microscopia óptica. As amostras foram coradas com eritrosina-b. Este corante permeia apenas as células mortas, que adquirirão a cor vermelha, enquanto as vivas (células viáveis) mantêm sua cor verde natural (TESSAROLLI *et al.* 2017). A viabilidade das amostras antes da criopreservação foi avaliada para controle e padronização de resultados. Após a criopreservação, 100 µL da cultura foram separados em um tubo de PCR de 200 µL, ao qual 30 µL de uma solução saturada de eritrosina foi adicionado e misturado. Após 5 min, as amostras foram analisadas por microscopia óptica e o número de células coradas (vermelho) e não coradas (verde) anotado, (um mínimo de 50 células foram contadas em cada

lâmina). A viabilidade das amostras foi calculado dividindo o número de células vivas (verde) pela quantidade total de células contadas (vermelho+verde), multiplicando os resultados por 100 para obter a porcentagem. Para evitar a subestimativa de viabilidade devido à presença de células mortas nas culturas originais (antes do congelamento), a viabilidade dessas amostras também foi calculada e considerada para os resultados finais de viabilidade. Quando necessário, comparações entre os tratamentos tempo e toxicidade do CPA foram realizados usando teste de Tukey para determinar quais eram estatisticamente significantes.

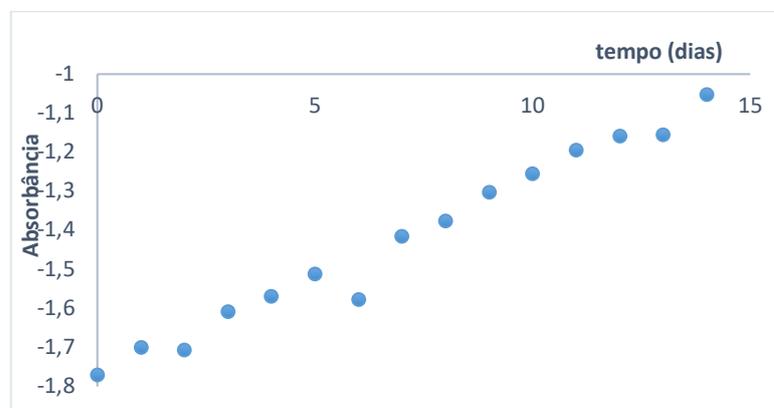
### 3.6 Análise estatística

Os dados tratados dos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados estatisticamente pelo teste de Tukey HSD (nível de significância  $p \leq 0,05$ ). Estas análises foram feitas utilizando o programa estatístico Action Stat 3.0. As representações gráficas foram feitas usando o software Excel.

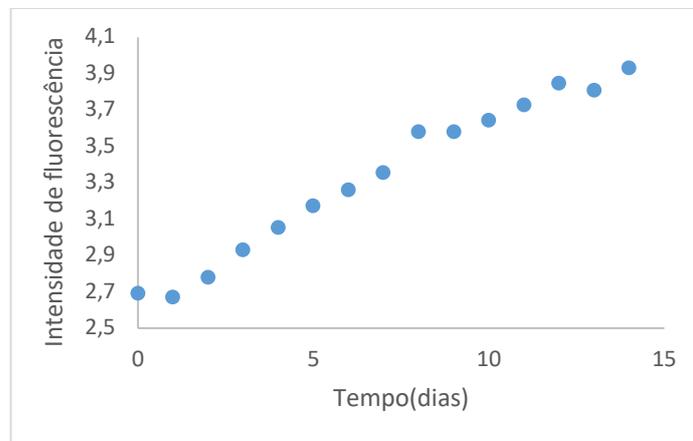
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Curvas de crescimento da cepa de *K. lunaris* (CCMA – 87)

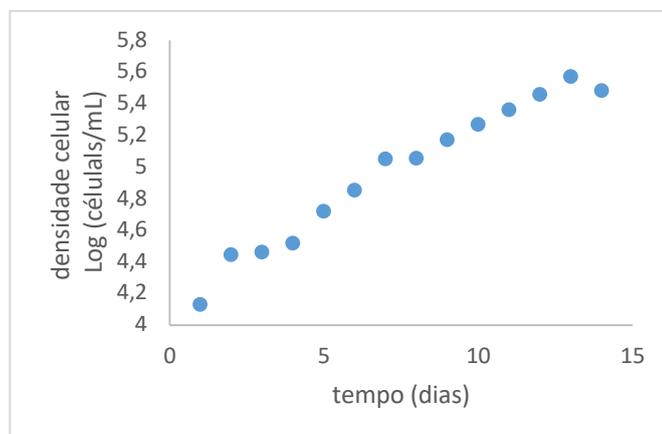
Inicialmente, para determinação da maior fase exponencial da alga para a realização dos experimentos posteriores e determinar o ponto ideal de densidade celular para a criopreservação foi realizado a curva de crescimento. Estes gráficos foram produzidos através da comparação entre absorbância x tempo, fluorescência x tempo e a contagem de células x tempo.



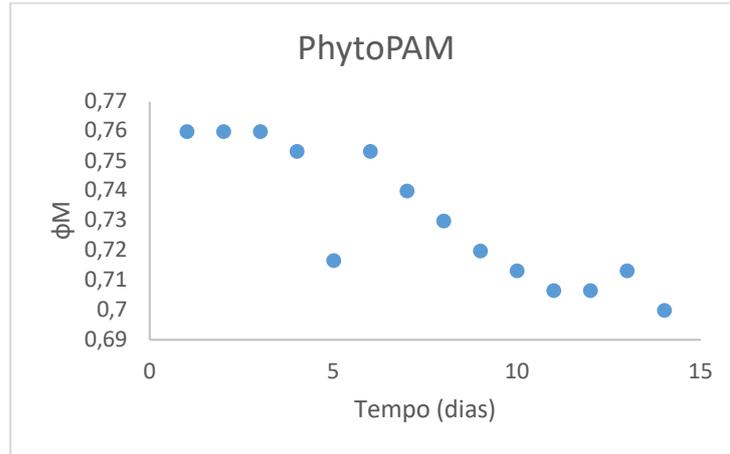
**Figura 3. Curva de crescimento algal. Relação entre a intensidade da absorbância em escala logarítmica (Ln) e o tempo experimental (dias) para a alga *Kirchneriella lunaris*. Cada valor representa a média (n=3)). O coeficiente de variação obtido variou de 10 a 15%.**



**Figura 4. Curva de crescimento algal. Relação entre a intensidade da fluorescência (U.A.) e o tempo experimental (dias) para a alga *Kirchneriella lunaris*. Cada valor representa a média (n=3)). O coeficiente de variação obtido variou de 10 a 15%.**



**Figura 5 Curva de crescimento algal. Relação entre a densidade populacional (células/mL) e o tempo experimental (dias) para a alga *Kirchneriella lunaris*. Cada valor representa a média (n=3)). O coeficiente de variação obtido variou de 10 a 15%.**

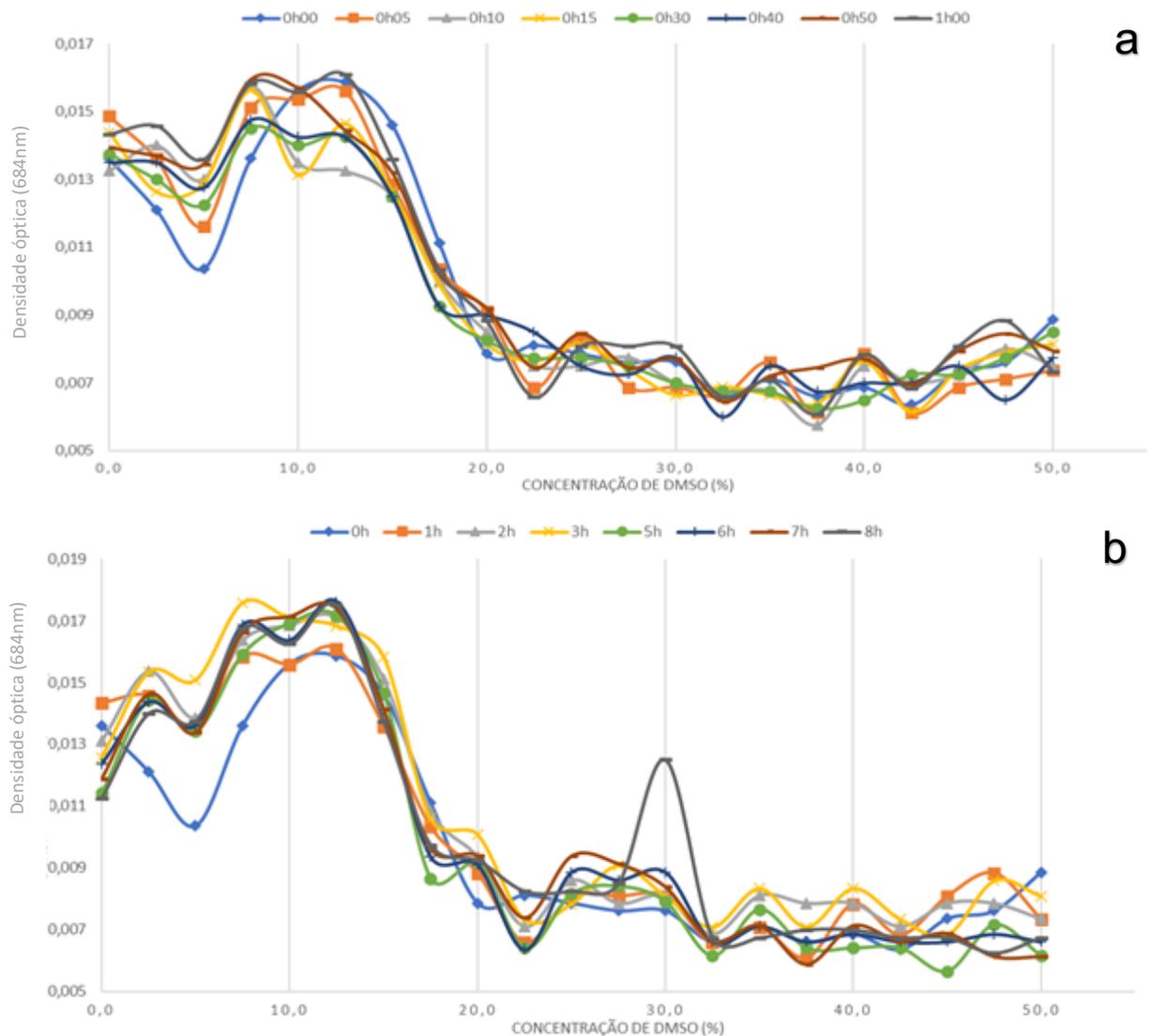


**Figura 6. Rendimento fotossintético máximo mensurado durante o cultivo da microalga *Kirchneriella lunaris* em função do tempo (dias) para avaliação do potencial fotossintético.**

Com base nas figuras (3, 4, e 5) foi realizado a escolha do 11º dia para o crescimento da microalga *K. lunaris* pois, as algas apresentavam um crescimento considerável. Neste período também foi comprovado uma boa faixa de tempo para ser utilizado pela microalga, pois no aparelho PhytoPAM (figura 6) foi apresentado um rendimento fotossintético acima de 0,7. Isso demonstrou um ponto de maior biomassa ainda em estado fisiológico ideal para montagem dos experimentos programados, e para maiores taxas de sucesso dos protocolos de criopreservação e obtenção de culturas viáveis

#### 4.2 Experimento toxicidade DMSO

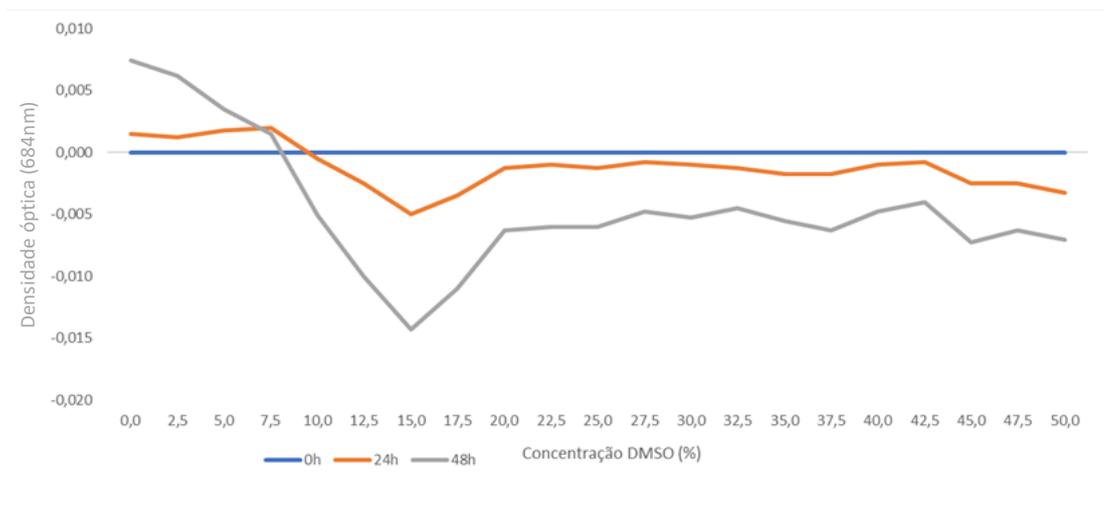
Análises iniciais da exposição de *K. lunaris* a diferentes concentrações de DMSO foram obtidas pelo acompanhamento do crescimento algal em placa de 96 poços. Inicialmente, não se observou diferença significativa pela ANOVA ( $p > 0,05$ ) entre 0h e 8h de análise entre os experimentos. Em ambos os gráficos das Figuras 7a e 7b (mostradas a seguir), é apresentado a densidade óptica relacionada ao tempo e as concentrações de criopreservador DMSO, notamos um decréscimo na concentração de microalgas a partir da concentração de 12,5% (v/v). Esse declínio indica o início dos efeitos tóxicos da concentração de DMSO para as algas *K. lunaris* e demonstra uma estabilização no gráfico 7b.



**Figura 7. Densidade optica de cultivos sob diferentes concentrações de DMSO. (a)** Densidade optica de *Kirchneriella lunaris* (684 nm) avaliadas em 1h. **(b)** Densidade optica de *Kirchneriella lunaris* ("684 nm) avaliadas em 8h.

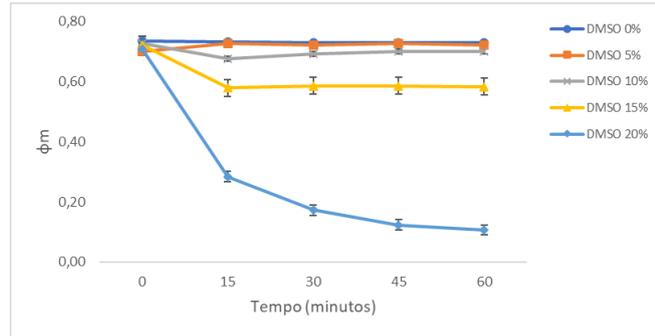
Observa-se pelo ponto de estabilização do gráfico apresentado na Figura 8, o início da morte celular das microalgas. Não houve diferença significativa considerando a diferença de horas de avaliação do experimento entre 1 e 2 dias de análise, porém foi possível encontrar diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando considerando as diferentes concentrações de DMSO em função da densidade final de microalgas presentes. Analisando todos os tratamentos, temos que o máximo de concentração de DMSO que pode ser utilizado para criopreservação é de 7,5% (v/v), quando considerado uma exposição menor que 48h das microalgas ao criopreservador, uma

vez que a partir do segundo dia de experimento, tal concentração começa a causar o declínio na densidade de microalgas, iniciando o processo de morte celular devido a toxicidade do CPA utilizado. É possível notar que com a análise após 24h, não há uma distinção tão grande na quantidade de algas, até 10% mantendo-se um valor próximo a 0,002, tal diferença se torna expressiva quando considerando 48h, quando uma mudança de 0 há 5 % da concentração do crioprotetor faz com que haja uma redução de mais da metade da densidade de microalgas inicial.



**Figura 8. Densidade optica (684nm) em função de diferentes concentrações de DMSO (v/v) e períodos de análise de 0h, 24h e 48h.**

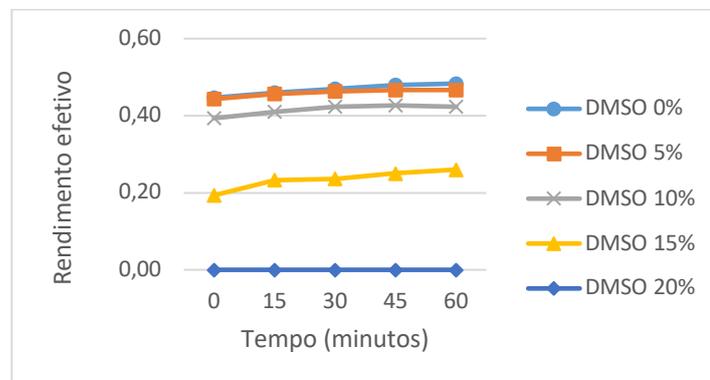
A Figura 9, mostrada a seguir, mostra o rendimento fotossintético máximo em função do tempo de exposição ao criopreservador em minutos, considerando o range de concentrações de DMSO de 0 a 20 % (v/v). Não houve diferença significativa pela ANOVA com  $p > 0,05$  entre o tempo de exposição, porém encontrou-se  $p < 0,05$  para a diferença do rendimento fotossintético máximo e as concentrações de DMSO, e de acordo com o gráfico, considerando a variação do rendimento de concentração em função do tempo de exposição, a concentração máxima observada nesse experimento a ser utilizada é de 10% (v/v) de DMSO, para que a concentração do CPA não apresente efeitos tóxicos que podem causar a perda da viabilidade celular.



**Figura 9. O rendimento fotossintético máximo em função de diferentes concentrações de DMSO e tempo de exposição.**

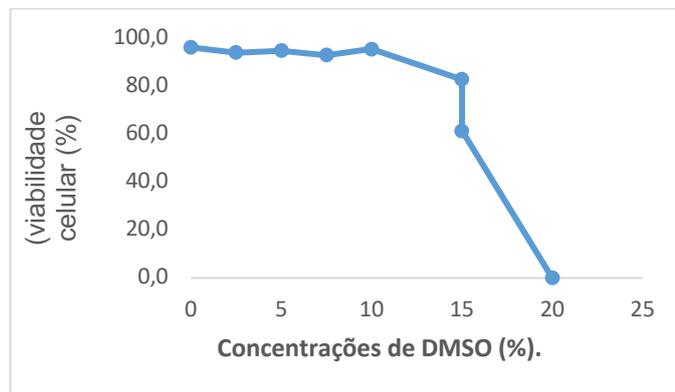
Na concentração de 10% (v/v), o criopreservante apresenta um bom rendimento da atividade fotossintética, mantendo-se na faixa dos 0, reforçando o conceito que concentrações menores de 10 % de DMSO devem ser utilizadas a fim de garantir os efeitos desejados da substância como criopreservador, sem apresentar efeitos tóxicos que declinam a atividade fotossintética.

Na Figura 9, podemos observar o rendimento fotossintético máximo, cujos resultados apresentam, a mesma tendência encontrada no gráfico 10, sendo necessário utilizar concentrações abaixo de 10% de DMSO para apresentar resultados satisfatórios na preservação fisiológica da microalga. A partir de concentrações maiores que 10%, inicia-se a perda do rendimento efetivo fotossintético ainda que por exposição de períodos muito curtos, havendo a perda total da viabilidade, do rendimento máximo da fotossíntese e inibição da sobrevivência das células com concentração de DMSO a 20%.



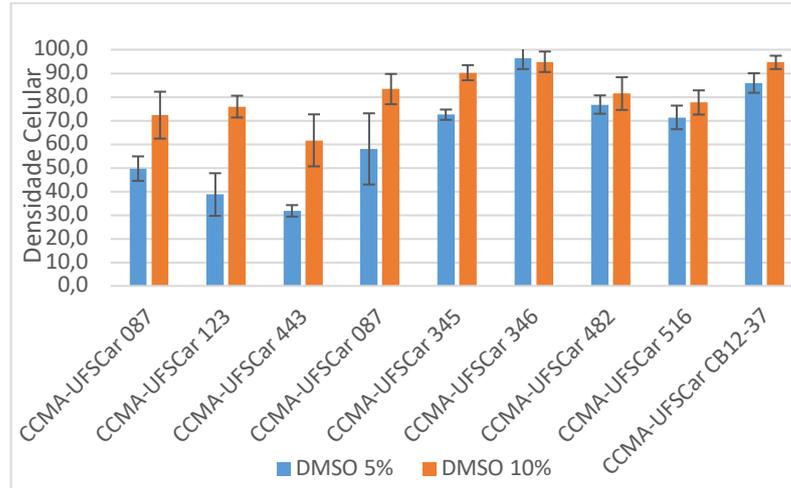
**Figura 10. Rendimento efetivo em função de diferentes concentrações de DMSO e tempo de exposição.**

Após todas as análises sobre os efeitos tóxicos de exposição em curto prazo das células de *K. lunaris* a diferentes concentrações de DMSO foi realizado o teste de viabilidades das células após o descongelamento. O teste da Figura 11, confirma as análises realizadas, onde à partir de uma exposição 10% (v/v) ao DMSO averiguamos o declínio da curva, chegando a se anular na concentração de 20% (v/v) demonstrando a morte celular total, comprovando validação da metodologia de análise e a otimização do protocolo para a cepa de *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 87).

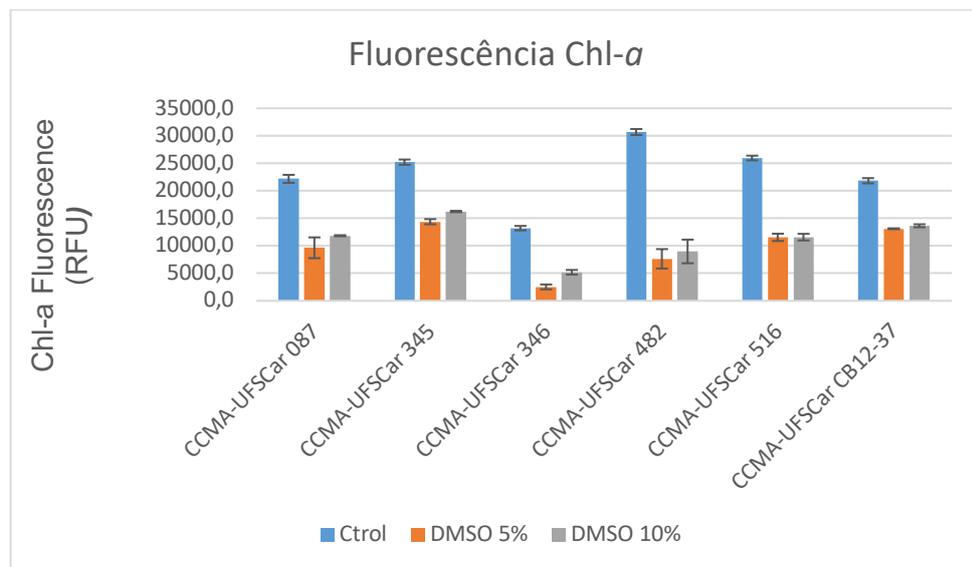


**Figura 11. Teste de Viabilidade Celular Média das células de *Kirchneriella lunaris* após o descongelamento, considerando diferentes concentrações de DMSO (%).**

Nas Figuras 12 e 13 consideram-se as seguintes espécies analisadas: *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 087), *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 123), *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 443), *K. obesa* (CCMA-UFSCar 345), *K. pseudoaperta* (CCMA-UFSCar 346), *K. aperta* (CCMA-UFSCar 482), *K. obesa* (CCMA-UFSCar 516) e *K. obesa* (CCMA-UFSCar CB12-37). Pelos protocolos utilizados, considerando uma concentração (v/v) de 10% de DMSO um aumento considerável na viabilidade das células após o congelamento, demonstrando que o protocolo adaptado e os experimentos realizados com outras concentrações de DMSO testado por Tessaroli (2017) apresentados, podem ser aplicados para diversas microalgas do gênero *Kirchneriella*.



**Figura 12. Viabilidade pós-congelamento de diferentes espécies de *Kirchneriella*, congeladas utilizando o protocolo padrão (azul, DMSO 5%) e o protocolo adaptado segundo experimento realizado (laranja, DMSO 10%).**



**Figura 13. Fluorescência da clorofila-a (RFU - unidades arbitrárias) de diferentes espécies de *Kirchneriella* do protocolo adaptado (barra cinza) em comparação com o protocolo de congelamento tradicional (barra laranja) de Tessaroli (2017).**

## 5. DISCUSSÃO

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 durante a análise da curva de

crescimento (Figuras 3, 4, 5) para o estabelecimento do momento com maiores concentrações de células a ser usado nos experimentos posteriores. Foi observado que o crescimento algal apresentou a fase de crescimento exponencial até o 12º dia. A fase de desaceleração (final da fase exponencial) ocorreu a partir do 13º dia. A literatura científica diverge quanto a fase ideal de congelamento de cepas de microalgas. Grandes coleções de algas (UTEX, CCAP, SAG, 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).

As microalgas reagem a diferentes concentrações de criopreservador, além de cada substância apresentar suas vantagens e malefícios. Isso ocorre devido a fatores de velocidade e temperatura do processo de resfriamento e descongelamento, tempo de exposição à substância, espécie da microalga e concentração (TAYLOR; FLETCHER, 1998).

NAKAWAZA & NISHII (2012) e JOSEPH et al. (2000) observaram eficácias variáveis de diferentes criopreservadores de acordo com as espécies estudadas. Para a *Kirchneriella lunaris* foi possível encontrar bons resultados com o congelamento em presença do DMSO. Este resultado contrapõe os dados 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 de *Kirchneriella lunaris* (CCMA –UFSCAR 87) apresentou uma boa viabilidade pós-congelamento quando as células foram submetidas ao processo de criopreservação na presença de DMSO até 10%(v/v). 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.

O uso de crioprotetores pode aumentar o número de células viáveis após o descongelamento uma vez que limitam a formação de gelo, sendo cada caso estudado empiricamente para determinar o melhor protocolo. Os principais CPA utilizados são DMSO, glicerol e metanol, sendo o DMSO o que apresenta a maior taxa de transferência. No geral, esses protetores para algas são utilizados em concentrações de 1-30%, sendo as mais utilizadas de 5-20%, para diversas substâncias como o DMSO, PVP, etanol, sorbitol entre outros. Também se nota que o tempo mais usual de exposição dessas substâncias varia de 30 a 45 minutos (TAYLOR; FLETCHER, 1998).

Dentre os resultados mostrado na Figura 8 é possível notar, que quanto menor o tempo de exposição, menor é o risco do efeito tóxico que o DMSO pode causar nas microalgas, levando a sua morte. Assim esse tempo varia de 30 a 45 minutos de exposição, resultado de acordo com o encontrado no experimento, cujo declínio iniciasse a partir de 30 minutos em quaisquer concentrações de criopreservante.

A literatura Taylor e Fletcher (1998) cita diversos protocolos utilizando o crioprotetor DMSO para análise do seus efeitos tóxico as microalgas, são eles: Hwang e Huddock (1971), realizaram o pré-tratamento para criopreservação utilizando a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* exposta a concentrações de 5-10% (v/v) de DMSO com o tempo de exposição de 10 minutos, Morris (1976) realizou o cultivo de *Chlorella* sp. utilizando um percentual de 2,5-5% de glicerol combinado com o DMSO por um tempo de exposição de apenas 5 minutos. Essa baixa exposição de tempo foi devido a alta capacidade penetrante da combinação dos criopreservantes. Em outros estudos como Gilboa e Ben-Amotz (1979) houve a aplicação de concentrações de 5–20% (v/v) de DMSO por 5 minutos que demonstraram bons resultados a reativação do estado fisiológico da microalga após a criopreservação.

Já para o DMSO e metanol, as concentrações de 5% e 10% não facultaram a retomada do crescimento celular, ou seja, apenas as amostras contendo 15% e 20% dos reagentes não sobreviveram, possivelmente devido a maior toxicidade dos mesmos nestas concentrações. Em trabalho similar, Gwo e outros (2005), ao trabalharem com a microalga *Nannocloropsis oculata*, verificaram toxidade para o DMSO e metanol apenas em concentrações maiores que 30%. Já a microalga *Skeletonema* sp. não resistiu a criopreservação em nenhuma das condições analisadas com diferentes concentrações dos criopreservantes (ABREU et al., 2012)

Após ser exposta a diferentes concentrações de DMSO, a alga *Kirchneriella lunaris* apresentou diferentes níveis de crescimento celular além de uma diferente quantificação de células viáveis após o descongelamento. Assim sugere-se que diferentes concentrações de DMSO podem afetar a produção de clorofila além de quando utilizado em grandes quantidades,

Quanto ao rendimento máximo fotossintético, os resultados mostraram aumento na atividade fotossintética e na concentração de clorofila a quando utilizada concentrações menores de 10%, conforme os resultados apresentados nos gráficos das Figuras 9 e 10. Ao longo do tempo, as reações de degradação enzimáticas vão se intensificando, ainda que as células estejam congeladas, o que ocasiona uma diminuição no número de células viáveis, sendo influenciada pelo tempo e temperatura de estocagem. Para diminuir essas reações, pode-se utilizar o criopreservante, porém sendo importante reforçar a toxicidade dessas substâncias. Esse efeito foi notado uma vez que após o descongelamento, os experimentos com maior concentração de DMSO apresentaram um número decrescente de células viáveis, podendo ser evitado de acordo com Taylor e Fletcher (1998), com a rápida diluição juntamente do descongelamento.

Observa-se, através da análise da viabilidade celular média (Figura 11), a existência de uma região com elevado percentual de recuperação de viabilidade celular após o descongelamento. A indicação de uma faixa ótima demonstra como parâmetro final o valor máximo a ser utilizado antes do início da morte celular e, portanto, queda da viabilidade das células (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

As figuras 11 e 12, caracterizam que até 10%(v/v) de DMSO é um região ótima definida pelo modelo para a cepa *Kirchneriella lunaris*, utilizando como critério para esta escolha a melhor concentração de agente crioprotetor dentro na região de máxima viabilidade celular. Deste modo podemos afirmar que a validação experimental foi efetuada expondo a cepa de *Kirchneriella lunaris* as condições ótimas de congelamento. Segundo Day (2004), o principal entrave na criopreservação de microalgas consiste no fato de que um protocolo eficiente para determinada espécie pode exibir bons resultados para estirpes próximas, mas não com espécies distantes. Isso é confirmado através da figura 12 e 13 onde diferentes cepas de *Kirchneriella* apresentaram diferentes condições após o descongelamento, devido a estas diferenças existentes entre espécies próximas de microalgas, talvez seja necessária

a adequação deste protocolo para tipos distintos de espécies de microalgas para atingir níveis mais altos de viabilidade.

## 6. CONCLUSÕES

As diferentes concentrações de DMSO aplicadas como criopreservante no cultivo e congelamento de microalgas *Kirchneriella lunaris* afetaram diretamente a quantidade de células viáveis após o descongelamento, o rendimento fotossintético máximo e o crescimento populacional.

Em relação a sua concentração para garantir os bons efeitos de preservação e principalmente a reativação do metabolismo celular, estas devem ser compreendidos na faixa entre 5-10 % (v/v), sugerindo que o DMSO possui propriedades tóxicas em concentrações superiores a esta, gerando a morte populacional e inibindo o crescimento das algas.

Todos estes fatores analisados permitiram a confirmação de uma possível otimização do protocolo de criopreservação dos organismos do gênero *Kirchneriella* sp. e a utilização do DMSO em concentração de 10% durante o protocolo em duas etapas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. *et al.* Cryopreservation of some useful microalgae species for biotechnological exploitation. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1579-1588, 2012.

AMARAL, M. de S. **Cultivo da microalga marinha *Chlorella* sp. como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2013. Dissertação (Mestrado em Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

ANDERSEN, R.A; KAWACHI, M. Capítulo 6: Traditional microalgae isolation and techniques, in: R.A. Anderson (Ed.), **Algae Culturing Techniques, Elsevier Academic Press & The Phycological Society of America Amsterdam**, 2005.

ANDRADE, D. S; FILHO, A. C. Microalgas de Águas Continentais. **Potencialidades e desafios do cultivo**. v.1, p. 126, 2014.

ANGELO, E. A; ANDRADE, D. S; FILHO, A. C. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. V.35, n.2, p.125-136, 2015

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. In: (Ed.). **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 89-113, 2008

BEN-AMOTZ, A.; GILBOA, A. Cryopreservation of marine unicellular algae. II. **Induction of freezing tolerance**. Mar. Ecol.-Progr. Ser. p.221-224, 1980.

BUI, T. V. L. *et al.* Impact of Procedural Steps and Cryopreservation Agents in the Cryopreservation of Chlorophyte Microalgae. **PLoS ONE**. v. 8, n. 11, 2013.

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

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revisão Brasil Reprodução Animal**. v.31, n.3, p.361-366, 2007.

CASTRO, S. V. *et al.* Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39, n. 2, p. 1–18, 2011.

CAÑAVATE, J. P; LUBIÁN, L. M. Effects of culture age on cryopreservation of marine microalgae. **European Journal of Phycology**. v.32, p. 87-90, 1997.

DAY, J. G; BRAND, J.J. Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. In: Algal culturing techniques. **Elsevier Academic Press**, p. 165-187, 2005.

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.; MCLELLAN, M. R. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: **Humana Press**, 1995.

DAY, J. G; FLECK, R. A. Cryo-injury in algae and the implications this has to the conservation of micro-algae. **Microalgae Biotechnology** v.1, p.11, 2015.

DAY, J; HARDING, K. Plant cryopreservation: a practical guide. **Springer**. p. 95-116, 2007.

DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DE VRIES, E. G.; VELLENGA, E.; LUIN-NELEMANS, J. C. The happy destiny of frozen haematopoietic stem cell: from immature stem cells to mature applications. **European Journal of Cancer Care**. v. 40, p. 1987-1992, 2004.

FUJISAWA, R. *et al.* Cryopreservation in 95% serum with 5% DMSO maintains colony formation and chondrogenic abilities in human synovial mesenchymal stem cells. **BMC Musculoskelet Disord**. v. 20, 2019.

GILBOA, A; AMOTZ, A. An improved method for rapid assaying of viability of cryopreserved unicellular algae. **Plant Science Letters** v14, p. 317-330,1979.

GUILARD, R.; LORENZEN, C. Yellow-green algae with chlorophyllide. **Journal of Phycology** v.8, p.10-14, 1972.

GWO, J. C. *et al.* **Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae)** *Cryobiology*, v.50, p. 338-343, 2005.

HIPKIN, R. *et al.* The first evidence for genotypic stability in a cryopreserved transgenic diatom. **Journal of Applied Phycology**, n. 26, p. 65-71, 2013.

HWANG, S.; HUDDOCK, G. A. Stability of *Chlamydomonas reinhardtii* in liquid nitrogen storage. **J. Phycol.**, v.7; p. 300-303; 1971.

KIM, H. *et al.* Effect of Marine-Derived Ice-Binding Proteins on the Cryopreservation of Marine Microalgae. **Marine Drugs**. v. 15, n. 12, p. 372, 2017.

KRIENITZ, L. *et al.* Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**. v. 37, n. 5, p. 852–865, 2001.

KUWANO, K. *et al.* Cryopreservation of the gametophytic cells of laminariales (phaeophyta) in liquid nitrogen. **Journal of Applied Phycology**. v. 40, p. 606- 610, 2004.

JOSEPH, I. *et al.* Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectant dimethyl sulfoxide, methanol and glycerol, **Indian Journal or Marine Sciences**, n. 29, p. 243-247, 2000.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 155–164, 2002.

LELIAERT, F. *et al.* Phylogeny and molecular evolution of the green algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.

LOMBARDI, A. T.; M. T. MALDONADO. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research** **101**, p. 77-87, 2011.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: **RiMa**. p. 588, 2006.

MASSUMOTO, C. M.; MIZUKAMI, S. Transplante autólogo de medula óssea e imunoterapia pós-transplante. **Medicina**. v. 33, p. 405-414, 2000.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F., **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, Ed. Cárita, 2ª. edição, Campinas. p.135–232, 2009.

MORSCHETT, H. *et al.* 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.

NAKANISHI, K.; DEUCHI, K.; KUWANO, K. Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage. **Journal of Applied Phycology** v.24,p.1381-1385, 2012.

NAKAZAWA, I. N., Amidic and acetic cryoprotectants improve cryopreservation of volvocine green algae, **CryoLetters**, v. 33, p. 201-212, 2012.

NORTON, T. A; MELKONIAN, M; ANDERSEN, R. A. Algal biodiversity. **Phycologia**. v. 35, p. 308–326, 1996.

OSORIO, H.C. *et al.* First attempts to cryopreserve strains from the Coimbra Collection of Algae (ACOI) and the use of image analysis to assess viability. **Nova Hedwigia**. v.79, p.227–235, 2004.

PRIYADARSHAMI, I; RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae - A review. **Journal Algal Biomass Utilization**.v.3, n.4, p. 89-100, 2012.

RAWLS, W. F; COX, L; ROVNER, E. S. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as intravesical therapy for interstitial cystitis/bladder pain syndrome: a review. **Neurourol Urodyn**. v. 36, n.7, p. 1677–1684, 2017.

RHODES, L. *et al.* Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. **Cryobiology**. v. 52, p. 152-156, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma sequência de planejamentos. **Editora Casa do Pão**, 2009.

SALAS-LEIVA, J.S; DUPRÉ, E. 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**. v. 39, p.271-279, 2011.

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.

TESSAROLLI, L. P; DAY, J. G; VIEIRA, A. A. H. Establishment of a cryopreserved biobank for the Culture Collection of Freshwater Microalgae (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**. v. 17, n. 2, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre, **RS:Artmed Editora S.A.**, 2006.

ZHAO, C.- M.et al. Effects of groundwater depth variation on photosynthesis and photoprotection of *Elaeagnus angustifolia* L. **Trees-Structure and Function**, v. 21, n. 1, p. 55-63, 2007.