

Rafael Garcia Lopes

**ANÁLISE MOLECULAR DA PRODUÇÃO DO ÁCIDO
EICOSAPENTAENOICO (EPA) PELA MICROALGA
Phaeodactylum tricornutum EM UM CONTEXTO
ECOFISIOLÓGICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e
Bióciências da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Leonardo Rubi
Röhrig, Dr.
Coorientador: Prof. Roberto Bianchini
Derner, Dr.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Rafael Garcia

Análise molecular da produção do ácido Eicosapentaenoico (EPA) pela microalga *Phaeodactylum tricornutum* em um contexto ecofisiológico / Rafael Garcia Lopes ; orientador, Leonardo Rubi Rörig, coorientador, Roberto Bianchini Derner, 2017.

98 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Microalgas. 3. Biologia Molecular. 4. Ácidos graxos poli insaturados. 5. Desaturases. I. Rubi Rörig, Leonardo. II. Derner, Roberto Bianchini. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Rafael Garcia Lopes

**Análise molecular da biossíntese do ácido Eicosapentaenoico (EPA)
pela microalga *Phaeodactylum tricornutum* em um contexto
ecofisiológico**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Biotecnologia e Biociências”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 09 de março de 2017.

Prof. Dr. Mário Steindel
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Leonardo Rubi Rorig, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Maria Risoleta Freire
Marques, Dr.^a.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. José Bonomi Barufi, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Rodolfo Petersen, Dr.
Universidade Federal do Paraná

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues
de Melo, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. André Oliveira de Souza
Lima, Dr.
UNIVALI

Esse trabalho é dedicado à minha família, namorada, colegas e orientadores.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha Família por ter me dado o amparo necessário servindo como o meu porto seguro durante esses quatro anos de doutorado, e 33 anos de vida. Ao meu Pai e minha Mãe, exemplos que tive durante a minha vida de pessoas corretas, trabalhadoras, honestas e que sempre estiveram perto para me ajudar. Tento respaldar a minha carreira acadêmica em cima dos ensinamentos de vida deles.

Faço aqui também um agradecimento mais do que especial a minha parceira, minha cara metade, Marília, por me aturar durante 8 anos, e duas pós-graduações. Só eu sei como fazes a minha vida melhor, com as suas palavras de incentivo e sua parceria, que me ajudaram a concluir mais esse momento de nossas vidas.

Preciso agradecer muito ao professor Leonardo Rubi Rörig, pela orientação e amizade durante todo o processo, e pela coragem por ter aceitado um orientado que iria manter um vínculo empregatício durante todo o projeto. Agradeço também ao professor por sempre se mostrar disposto a ajudar, fazendo com que a conclusão dessa etapa ocorresse da maneira menos estressante possível. Espero que a nossa parceria continue rendendo frutos.

Não poderia me esquecer de agradecer ao meu coorientador, e também meu chefe como coordenador do Laboratório de Cultivo de Algas da nossa Universidade, professor Roberto Bianchini Derner. Gostaria de agradecê-lo pelos quase 7 anos de parceria prolíficos – orientações, projetos, publicações – e pela amizade cultivada durante esse tempo. Devo muito do meu desenvolvimento científico atual ao professor e à equipe do LCA.

Queria agradecer a todos os envolvidos direta e indiretamente na execução desse projeto de Tese, pois não caminhei sozinho nessa jornada. Deixo meus agradecimentos especiais aos colegas, o Eng. Aquicultura Herculano Cella e ao Biólogo Jacó Joaquim Mattos, por suas contribuições e auxílio durante esse período.

Agradeço humildemente à equipe do LCA – alunos da graduação e pós-graduação. Se consegui ensinar alguma coisa para os alunos que fizeram e ainda fazem parte da nossa equipe, acredito que aprendi ainda mais com eles e suas histórias de vida.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus antigos orientadores prof^{al}. Maria Risoleta Freire Marques e prof. Bóris U. Stambuk e aos colegas de outros laboratórios. Sem eles, esses 14 anos de caminhada na vida acadêmica não teriam sido possíveis.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros
de gigantes”
(Isaac Newton)

RESUMO

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA), especialmente os ácidos Eicosapentaenoico (EPA) e Docosahexaenoico (DHA) da família ω -3 são reconhecidos como nutracêuticos e desempenham papéis importantes na sanidade animal e humana. Entretanto, existe uma crescente preocupação tanto em relação à possível contaminação, quanto à sustentabilidade no fornecimento da matéria-prima fonte desses ácidos graxos. Nesse cenário, as microalgas (produtoras naturais de PUFA) podem se tornar uma fonte alternativa à produção de ácidos graxos poli-insaturados. Uma espécie, *Phaeodactylum tricornerutum*, naturalmente acumula elevadas concentrações de EPA, o que faz dessa diatomácea uma espécie promissora como fonte de PUFA ω -3. Contudo, ainda não é bem compreendido qual é a possível interação ambiental na biossíntese de EPA em um nível molecular. Em um primeiro estudo, foi avaliada a possível modulação nos níveis de transcrição de seis genes envolvidos na biossíntese de EPA – as desaturases *PTD15*, *PTD6*, *PTD5* alfa e beta e as elongases *ELO6* b1 e b2 – em diferentes razões N/P (21/1, 14/1 e 7/1) e em diferentes fases de cultivo. Todos os níveis de transcrição foram dependentes da fase de cultivo, enquanto somente dois genes (*PTD6* e *PTD5* alfa) foram modulados por uma razão N/P. O perfil de expressão gênica (*PTD5* alfa) pode estar associado aos níveis de EPA em pelo menos em uma razão N/P (21/1). Com os dados dos níveis de transcritos, concentrações de EPA e a falta de alguns intermediários da via poderiam indicar algum tipo de regulação entre a transcrição gênica e a biossíntese de EPA. Já em um segundo trabalho, foi verificada a influência de três diferentes fotoperíodos (24:0, 16:8 e 12:12) na transcrição dos mesmos seis genes da via de síntese de EPA. Os níveis de transcrição foram distintos entre os três regimes de iluminação empregados, com um padrão de sobre-expressão no fotoperíodo 12:12 em relação aos outros dois tratamentos. No fotoperíodo 16:8, os perfis dos transcritos atingiram um pico de expressão ao final do período escuro. Já as culturas iluminadas continuamente não apresentaram mudanças nos perfis de expressão relativa dos genes associados. Por último, os genes *PTD5* alfa e *PTD6* apresentaram um padrão de coexpressão em todos o tratamentos, possivelmente indicando a importância de ambos na biossíntese de EPA.

Palavras-chave: PUFA; desaturases; diatomáceas; expressão gênica; lipídios.

ABSTRACT

The long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA), notably the Eicosapentaenoic (EPA) and Docosahexaenoic (DHA) acids of the ω -3 family are acknowledged as nutraceuticals and play important roles in human and animal health. However, there is a crescent concern in a possible contamination, as well as the sustainability in the fatty acids natural sources supply. In this scenario, microalgae (natural PUFA producers) could become an alternative source at PUFA production and supply. One species, *Phaeodactylum tricornerutum*, naturally accumulates high EPA contents, which makes this diatom a promising species as a ω -3 PUFA source. Nevertheless, it is still not well understood the possible environment interaction on EPA biosynthesis on a molecular level. In the first study, it was evaluated the possible modulation of six gene transcript levels involved in EPA biosynthesis – desaturases *PTD15*, *PTD6*, *PTD5* alpha, beta and elongases *ELO6* b1, b2 – in different N/P ratios (21/1, 14/1 and 7/1) and in different cultivation phases. All gene transcription levels were growth phase dependent, while only two genes (*PTD6* and *PTD5* alpha) were modulated by N/P ratios. At least in one N/P ratio (21/1), one gene expression profile (*PTD5* alpha) might be associated with the EPA levels. Data from gene transcripts, EPA concentration, and the lack of some EPA intermediates might indicate some type of regulatory step between gene transcription and actual EPA biosynthesis. In the second work, it was verified the influence of three different photoperiods (24:0, 16:8 and 12:12) in the transcription levels of the same six genes involved in EPA biosynthesis. The transcription levels were distinct among the three illumination regimes employed, with a 12:12 photoperiod upregulation pattern in relation to the other two treatments. In the 16:8 photoperiod, the transcript profiles presented an upregulated expression peak at the end of the dark period. While the cultures with continuous illumination did not present changes at the relative associated gene expression levels. Lastly, the *PTD5* alpha and *PTD6* genes showed a co-expression pattern in all treatments, which possibly indicates the importance of both expression products in the EPA biosynthesis.

Keywords: PUFA; desaturases; diatoms; gene expression; lipids.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Exemplos de PUFAs ω -3 e ω -6.....	22
Figura 2. Relação ω -6/ ω -3 de diferentes fontes de alimento.....	24
Figura 3. Plasticidade de rotas metabólicas para produção de PUFAs de cadeia longa em microalgas.....	27
Figura 4. Exemplos de microalgas produtoras de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa.....	29
Figura 5. Estruturas dos principais glicerolípídios encontrados em algas.....	31
Figura 6. Número de trabalhos científicos publicados em periódicos indexados com <i>P. tricornutum</i> entre 1958 e 2016.....	33
Figura 7. Possíveis vias de síntese de EPA em <i>P. tricornutum</i> de acordo com Arao e Yamada (1994).....	35
Artigo 1	
Figure 1. EPA biosynthesis possible pathways, according to Arao and Yamada (1994).....	70
Figure 2. Cellular Density (A), Biomass (B), Nitrate concentration (C) and Orthophosphate concentration (D) during 12 cultivation days of <i>P. tricornutum</i>	71
Figure 3. Relative gene expression of <i>PTD15</i> , <i>PTD6</i> , <i>ELO6 b1</i> , <i>ELO6 b2</i> , <i>PTD5</i> alfa and <i>PTD5</i> beta using <i>RPS</i> and <i>H4</i> as reference genes, in 21/1, 14/1 and 7/1 N/P ratios in the exponential (EXP) and stationary (STA) cultivation phase.....	72
Artigo 2	
Figure 1. Acclimation and growth curve in biomass of <i>P. tricornutum</i> (A) and the effect of the biomass dilution on the irradiance in 3 positions inside of each experimental unit.....	87
Figure 2. Chlorophyll a (Chla), Chlorophyll c (Chlc), Fucoxanthin, Diadinoxanthin and β -Carotene concentrations (mg g^{-1} DW) during 26 hours at different photoperiods: 12:12 (A), 16:8 (B) and 24:0 (C).....	88
Figure 3. Relative transcript levels (Log_2 Ratio) of <i>PTD15</i> , <i>PTD6</i> , <i>ELO6 b1</i> , <i>ELO6 b2</i> , <i>PTD5</i> alfa and <i>PTD5</i> beta using <i>RPS</i> , <i>H4</i> and <i>TBP</i> as reference genes during 26 hours, at three different photoperiods: 12:12 (A), 16:8 (B) and 24:0 (C).....	89

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Exemplos de trabalhos sobre a produção de EPA em *P. tricornutum*.....34

Artigo 1

Table 1. List of primers used, gene names, primer names, sequences, amplicon size, and NCBI Reference Sequence (NCBI GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).....68

Table 2. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles in percentage of total Fatty Acids (FA) of *P. tricornutum* biomass in different N/P ratios and cultivation phases.....69

Artigo 2

Table 1. List of primers used, gene names, primer names, sequences, amplicon size, and NCBI Reference Sequence (NCBI GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).....86

SUMÁRIO

1	Revisão Bibliográfica	17
1.1	Ácidos Graxos Poli-insaturados	17
1.2	Microalgas como fontes alternativas de PUFA's de cadeia longa.21	
1.3	Diatomáceas e <i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	28
1.4	<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> e Biologia Molecular	34
1.5	Referências Bibliográficas	38
2	Justificativa	47
3	Objetivos	47
3.1	Objetivo Geral	47
3.2	Objetivos específicos.....	47
3.2.1.	Determinar o impacto de diferentes concentrações de ortofosfato e fases de crescimento no perfil de transcrição gênica da biossíntese e concentração de EPA na biomassa de <i>P. tricornerutum</i> (Artigo 1).....	47
3.2.2.	Quantificar a influência de diferentes regimes de iluminação (fotoperíodo) no teor de pigmentos e no perfil de transcrição gênica da biossíntese de EPA em <i>P. tricornerutum</i> (Artigo 2).....	47
4	Artigo 1.....	49
4.1	Introduction	50
4.2	Material and methods	52
4.2.1	Culture conditions and experimental design	52
4.2.2	Growth evaluation.....	52
4.2.3	Nutrient analysis	52
4.2.4	RNA purification and cDNA synthesis.....	53
4.2.5	qPCR conditions/analysis	53
4.2.6	Relative gene transcription/expression levels	54
4.2.7	Fatty acid methyl esters (FAME) analysis.....	54
4.2.8	Statistical analysis	55
4.3	Results.....	55
4.3.1	Growth and nutrient assimilation.....	55
4.3.2	Fatty acid composition analysis	56
4.3.3	Transcription levels of EPA biosynthesis pathway genes	57
4.4	Discussion	57

4.5	Acknowledgments	60
4.6	Conflict of interest	61
4.7	References	61
5	Artigo 2	69
5.1	Introduction	70
5.2	Material and methods	72
5.2.1	Culture conditions and experimental design.....	72
5.2.2	Growth evaluation.....	72
5.2.3	Pigment Analysis	72
5.2.4	RNA purification and cDNA synthesis	73
5.2.5	qPCR conditions/analysis	73
5.2.6	Relative gene transcription/expression levels.....	74
5.3	Results	74
5.3.1	Acclimation and growth evaluation of <i>P. tricornutum</i> under 3 different photoperiods	74
5.3.2	Pigment Analysis	75
5.3.3	EPA biosynthesis pathway gene expression.....	76
5.4	Discussion	76
5.6	Acknowledgments	79
5.7	References	79
6	Discussão dos resultados	86
7	Conclusões	95
8	Lista de publicações durante o doutorado	97

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Ácidos Graxos Poli-insaturados

O termo nutracêutico – derivado das palavras nutrição e farmacêutico – foi usado a primeira vez pelo Dr. Stephen DeFelice em 1979, que o define como um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios à saúde de quem o ingere, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças (KALRA, 2003). Nutracêuticos podem ser definidos também como suplementos da dieta a fim de melhorar a saúde que entregam uma forma concentrada de um agente, presumidamente com função bioativa de um alimento, quando aquele é usado em doses superiores àquelas que poderiam ser obtidas pela alimentação normal (ZEISEL, 1999).

Estes alimentos abrangem uma gama de produtos, desde plantações de grãos geneticamente modificados a simples barras de cereais suplementadas com vitaminas e minerais, os quais estão cada vez mais populares entre consumidores que buscam influenciar a própria saúde e bem-estar através de sua alimentação (BROWER, 1998).

As moléculas com funções bioativas presentes nos nutracêuticos são variadas, podendo incluir complexos vitamínicos de origens variadas, aminoácidos, carboidratos, moléculas de metabolismo secundário vegetal como flavonoides, alcaloides, terpenos, etc. (ESPÍN et al., 2007).

Dentre esses componentes moleculares, podem ser citados os ácidos graxos poli-insaturados – PUFA, do inglês “polyunsaturated fatty acids” –, que consistem em ácidos carboxílicos de cadeias longas com mais de duas insaturações, encontrados nos reinos animal e vegetal, mas com uma maior diversidade em algas, fungos e bactérias (GILL; VALIVETY, 1997). Esses PUFA são considerados essenciais à dieta dos animais, que embora consigam sintetizar ácidos graxos saturados e monoinsaturados de fontes não lipídicas, são incapazes de realizar a síntese *de novo* dos hidrocarbonetos poli-insaturados (HULBERT; ABBOTT, 2011).

Em humanos, tais moléculas exercem funções de extrema importância no desenvolvimento cognitivo e servem como precursores em processos inflamatórios e imunogênicos, plasticidade sináptica, transmissão dos impulsos nervosos, e podem também prevenir e tratar um número significativo de doenças e desordens metabólicas (RUXTON et al., 2004; YASHODHARA et al., 2009; DECKELBAUM;

TORREJON, 2012; SWANSON et al., 2012; LUCHTMAN; SONG, 2013).

As duas principais famílias de PUFA com atividades biologicamente ativas distinguem-se pela distância da última dupla ligação no final metil de sua cadeia carbônica: PUFA ω -3 (ou n-3), que corresponde a um grupo cuja última dupla ligação está localizada a três carbonos do carbono ω ; e os PUFA ω -6, a seis carbonos de distância de ω (Figura 1) (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2011).

Figura 1. Exemplos de PUFAs ω -3 e ω -6. Ácido Eicosapentaenoico (A) e Ácido Araquidônico (B).

A 20:5 ω -3 (EPA)



B 20:4 ω -6 (ARA)



Adaptado de Gill e Valivety (1997). A última ligação da cadeia está realçada em negrito.

Devido à importância da inclusão dessas famílias de ácidos graxos na dieta humana, a Organização Mundial de Saúde começou, a partir de 1989, a recomendar a ingestão de PUFA, e mais especificamente em 2002, colocava como meta o consumo de 5-8% de ω -6 e 1-2% de ω -3 do total energético diário (NISHIDA et al., 2007).

Humanos, assim como outros mamíferos são incapazes de fazer a interconversão enzimática de uma família de PUFA em outra, o que torna necessário um consumo balanceado das duas classes de ácidos graxos. Na dieta ocidental há um desequilíbrio no consumo de PUFA – na razão ω -6/ ω -3, com valores superiores a 10/1 –, o que pode acarretar problemas cardíacos e inflamatórios generalizados (SIMOPOULOS, 1991).

De acordo com a Figura 2, pode-se também notar o desbalanço da dieta ocidental na ingestão de ácidos graxos ω -6, pois fontes vegetais típicas como cenoura, ervilhas, além de fontes animais como frangos e suínos, possuem razões ω -6/ ω -3 de até 4/1. Com a contribuição desses e outros alimentos, essa desproporção pode chegar até 15/1 na dieta de países americanos e europeus não litorâneos (SIMOPOULOS, 2002; MÜHLROTH et al., 2013).

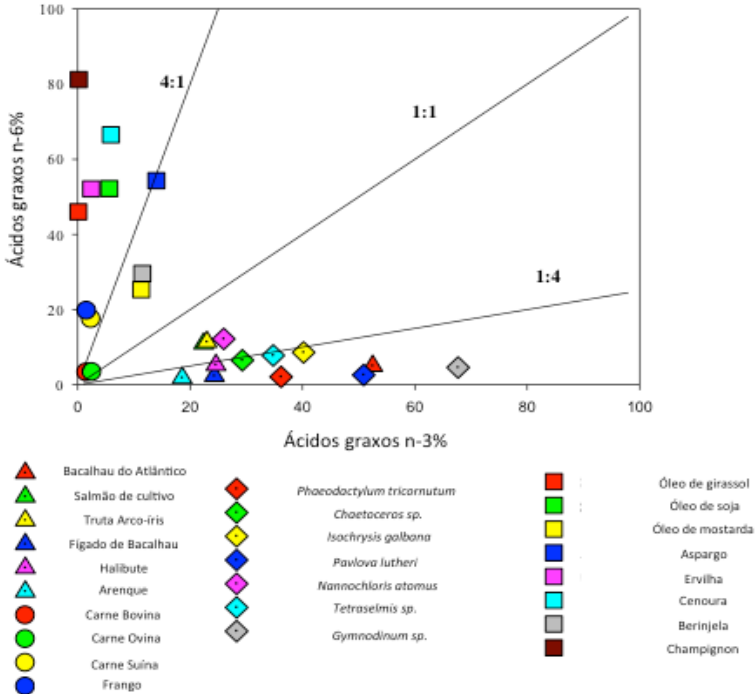
O grupo dos PUFA ω -3 gera efeitos biológicos diferentes quando comparados a outras famílias de ácidos graxos. Provavelmente, essas características advêm não somente do tamanho de suas cadeias carbônicas (>18C), mas também pelo grande número de insaturações que contêm, o que lhes proporciona propriedades bioquímicas e estereoquímicas distintas (DECKELBAUM; TORREJON, 2012).

Destacam-se nessa família o ácido Eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω -3) e o ácido Docosahexaenoico (DHA, C22:6 ω -3), duas moléculas que desempenham papéis importantes na sanidade animal e humana. Na infância, por exemplo, são responsáveis pelo melhoramento do desenvolvimento cognitivo e aprendizado, assim como pelo desenvolvimento visual (KARR et al., 2011). O incremento desses PUFA na dieta também se mostrou benéfico para a diminuição do risco de depressão e no retardo da degeneração neurológica relacionado ao envelhecimento (KARR et al., 2011; LUCHTMAN; SONG, 2013). Pode-se, ainda, citar a importância da ingestão desses ácidos graxos como protetores cardiovasculares, precursores de eicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, os quais constituem moléculas mediadoras de processos inflamatórios e imunogênicos (SIMOPOULOS, 1991; RUXTON et al., 2004).

Com relação à matéria-prima para fornecimento dessas biomoléculas, os frutos do mar – peixes, crustáceos e moluscos – ainda são a fonte principal de PUFA ω -3 de cadeia longa na dieta humana e animal. Contudo, existe uma preocupação crescente tanto em relação à possível presença de contaminantes, quanto à sustentabilidade no fornecimento desses produtos de origem marinha para o mercado consumidor (NICHOLS et al., 2010).

Alguns estudos apontam que estes recursos pesqueiros têm apresentado contaminantes lipossolúveis como PCBs (do inglês, PolyChlorinated Byphenil), dioxinas e até mesmo metais pesados como o mercúrio, os quais podem vir a se acumular nesses óleos e chegam até mesmo a tornar necessária a limitação do consumo por crianças e mulheres em gestação (WARD; SINGH, 2005). Essas fontes ainda têm sofrido com a diminuição excessiva de seus estoques naturais, devido ao aumento do esforço de pesca, aquecimento dos oceanos, entre outros fatores (NICHOLS et al., 2010).

Figura 2. Relação ω -6/ ω -3 de diferentes fontes de alimento.



Adaptado de Mühlroth et al. (2013).

Independentemente da problemática no suprimento de fontes de PUFAs ω -3, a partir da comprovação dos efeitos positivos dessas moléculas à saúde, tem-se buscado suplementar alimentos como leite, pães, ovos, entre outros, além do aumento da busca de suplementos dietéticos, como, por exemplo, cápsulas de EPA e DHA (TUR et al., 2012).

Portanto, tendo em vista os problemas de abastecimento da indústria pesqueira e o aumento da suplementação desses ácidos graxos em outros alimentos, os sistemas de produção aquícolas vêm tendo uma participação cada vez mais importante no mercado, a fim de suprir a necessidade crescente por essas biomoléculas. Entretanto, nas últimas duas décadas essa nova indústria vem substituindo a farinha e óleo de peixe da composição da ração de engorda utilizada na piscicultura por farinha e óleos de origem vegetal, a fim de manter o ritmo de crescimento e suprir a crescente demanda. Com isso, os teores de PUFA

ω -3 presentes na carne de salmonídeos de cultivo vêm paulatinamente caindo, principalmente nos níveis de moléculas como EPA e DHA (TOCHER, 2010).

Ademais, esses óleos extraídos de peixes oleaginosos usualmente trazem outras características que desfavorecem o seu consumo, tais como odor e gosto desagradáveis, rancificação (baixa estabilidade oxidativa), contaminação, além de grande variabilidade entre espécies, partes do peixe, e local de pesca (SPOLAORE et al., 2006).

Ante o exposto, faz-se necessária a busca por fontes alternativas e mais promissoras no fornecimento dos PUFA ω -3 de cadeia longa.

1.2 Microalgas como fontes alternativas de PUFA de cadeia longa.

As algas podem ser definidas como um grupo de organismos talófitos que possuem clorofila *a* como o seu pigmento fotossintético primário e não detêm uma camada de células em volta de suas células reprodutivas, conceito que abrange um grande número de taxa, sem ter, necessariamente, um ligação evolutiva (LEE, 2008).

Dentro desse agrupamento artificial, as microalgas podem apresentar várias aplicações biotecnológicas, das quais se pode citar: biofixação de CO₂ e outros Gases do Efeito Estufa; tratamento de efluentes líquidos domésticos através da remoção de NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻; produção da biomassa para extração de vários compostos de interesse (PUFA, pigmentos naturais, polissacarídeos, moléculas antioxidantes, compostos bioativos etc.) e, mais recentemente, como fonte de biocombustíveis (BOROWITZKA, 1995; PULZ; GROSS, 2004; CHISTI, 2007; WANG et al., 2008; BRENNAN; OWENDE, 2010).

Essa considerável gama de aplicações biotecnológicas somente é possível devido às características biológicas desses micro-organismos como rápido crescimento e elevada produtividade por área e/ou volume, quando comparados à plantações de outros grupos vegetais, como gramíneas e leguminosas. Geralmente, o cultivo microalgal é menos oneroso e pode ser realizado em ambientes inviáveis à agricultura e outras atividades humanas, motivo pelo qual não competem por recursos hídricos, terras aráveis etc. (BOROWITZKA, 1992; MATA et al., 2010).

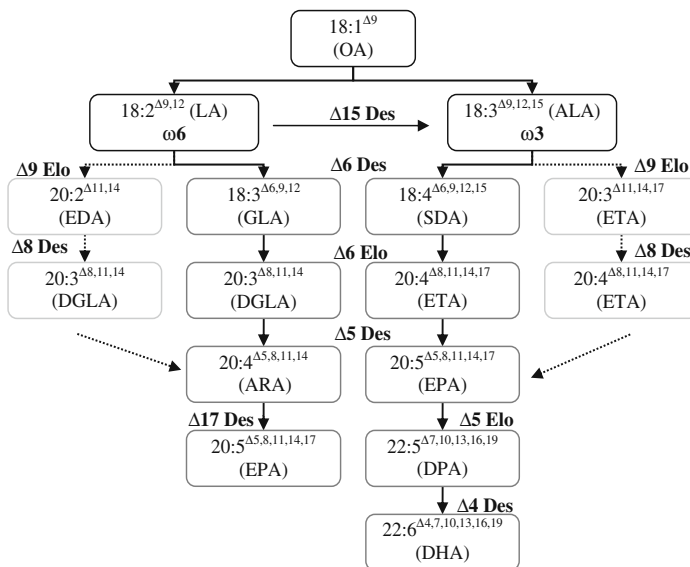
Com base nas aplicações e vantagens, as microalgas podem se tornar uma fonte alternativa à produção de ácidos graxos poli-insaturados, pois são consideradas um grupo diverso de micro-organismos que, como base da cadeia trófica de ambientes marinhos,

estuarinos e límnicos, são produtores naturais de PUFA de cadeia longa. Essas biomoléculas podem ser produzidas de maneira heterotrófica, fotoautotrófica ou mixotrófica, por diferentes grupos do fitoplâncton como Bacillariophyceae (diatomáceas), Chlorophyta (algas verdes) e Rhodophyta (algas vermelhas), entre outros (RATLEDGE; COHEN, 2008; KHOZIN-GOLDBERG et al., 2011; SATYANARAYANA et al., 2011).

A família de PUFA ω -3 de cadeia longa – principalmente EPA e DHA – é relativamente abundante em espécies marinhas, característica que já vem sendo explorada em setores da aquicultura, como a larvicultura, nos quais algumas espécies de microalgas são cultivadas para servir como alimento vivo. De fato, como essas microalgas acumulam naturalmente PUFA de cadeia longa, esses organismos são a base da cadeia alimentar dos oceanos, por exemplo. Já o grupo dos PUFA ω -6 é relativamente raro em algas marinhas e surge principalmente como metabólitos intermediários na produção de EPA (BOROWITZKA, 1997; SPOLAORE et al., 2006).

A biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa começa a partir de cadeias de 18 carbonos, e pode envolver diferentes rotas através de etapas de oxidação (aumento do número de insaturações) catalisadas por enzimas denominadas desaturases; e alongação da cadeia carbônica repetida várias vezes e catalisada por elongases nos mais variados grupos de microalgas (Figura 3) (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016).

Figura 3. Plasticidade de rotas metabólicas para produção de PUFAs de cadeia longa em microalgas.



Adaptado de Khozin-Goldberg et al. (2011). Legenda: Ácidos graxos - OA ácido oléico; LA ácido linoléico; ALA ácido alfa-linolênico; EDA ácido eicosadienoico; GLA ácido gama linolênico; SDA ácido estearidônico; DGLA ácido dihomo-gama-linolênico; ETA; ácido eicosatetranoico; ARA ácido araquidônico; EPA ácido eicosapentaenoico; DPA ácido docosapentaenoico; DHA ácido docosahexaenoico. Enzima – $\Delta(X)$ Des – Desaturase; $\Delta(X)$ Elo – Elongase.

De acordo com o E.C. (Enzyme Commission of IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology), as desaturases são enzimas da classe das mono-oxigenases sem o grupamento Heme e necessitam de um ambiente oxidante (presença de oxigênio e doadores de elétrons). Essas enzimas são ligadas à membrana e comumente são encontradas no retículo endoplasmático e no cloroplasto em microalgas, e como doadores de elétrons são utilizadas a ferredoxina e o citocromo b5, no cloroplasto e retículo, respectivamente (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016).

Existem ainda algumas desaturases denominadas “front-end”, como $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ e $\Delta 8$, por exemplo, que consistem em proteínas fusionadas ao doador de elétrons, nesse caso o citocromo b5. Essas enzimas introduzem duplas ligações entre uma dupla ligação pré-

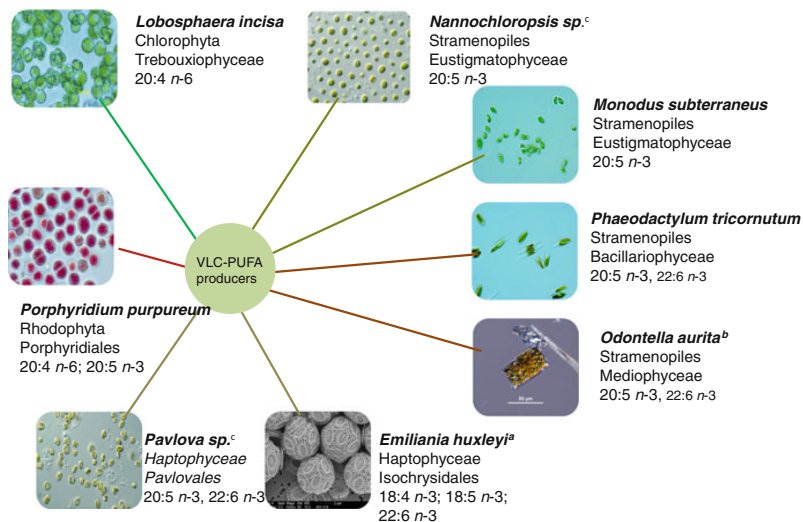
existente e o grupo carboxila do ácido graxo. Em relação à estrutura primária, essas desaturases possuem sequências bastante similares, e muito provavelmente tenham evoluído a partir de um ancestral comum (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016).

Para que seja possível identificar desaturases putativas no genoma de microalgas, se fazem necessários estudos de expressão heteróloga a fim de determinar suas funções. Esses ensaios são comumente feitos em sistemas de expressão eucariotos com baixo teor de ácidos graxos insaturados, como na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual possui somente uma desaturase $\Delta 9$, envolvida na produção de ácidos graxos monoinsaturados. De fato, um grande número de desaturases do tipo “front-end” tem sido identificado dessa maneira nos últimos anos (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016).

Por exemplo, a microalga *Lobosphaera (Parietochloris) incisa*, rica em ácido araquidônico (AA), produzido na via de PUFA ω -6, teve suas desaturases $\Delta 5$ e $\Delta 6$ clonadas e expressas em *S. cerevisiae*, onde atuaram tanto em ácidos graxos ω -3 e ω -6 e com eficiências similares às encontradas na microalga, e portanto, confirmando suas identidades. (ISKANDAROV et al., 2010).

Já as elongases se dividem em três tipos, que diferem entre si em relação à especificidade do substrato, e são encontradas em microalgas produtoras de ácidos graxos de cadeia longa: Elongases $\Delta 6$ que possuem como substrato ácidos graxos C18 (C18:3 ω -6, C18:4 ω -3), participando da biossíntese de PUFA C20 como os ácidos Araquidônico e Eicosapentaenoico; Elongases $\Delta 5$ com especificidade para PUFA C20 que fazem parte da elongação de EPA na biossíntese de DHA; Elongases $\Delta 9$ que também possuem como substrato ácidos graxos C18, porém tem uma especificidade por C18:2 ω -6 e C18:3 ω -3 (vide Figura 3) (MEYER et al., 2004).

Figura 4. Exemplos de microalgas produtoras de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa.



Retirado de Khozin-Goldberg et al. (2016). VLC-PUFA (do inglês Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid).

Na Figura 4, estão exemplificadas espécies de alguns grupos taxonômicos produtoras de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, as quais possuem potencial biotecnológico, com vasta informação na literatura sobre e seu cultivo e algumas com o seu genoma completamente sequenciado e publicado (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2011).

Por exemplo, algumas empresas têm desenvolvido tecnologias para obter EPA a partir de algas do gênero *Nannochloropsis*, como a Aurora Algae, que informa produzir um óleo rico em EPA (>65%), focando nas indústrias farmacêutica e de suplementos (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016). A diatomácea *Odontella aurita* foi aprovada para uso como suplemento alimentar em nutrição humana, uma vez que foram comprovados seus efeitos positivos em dislipidemia, no correto funcionamento de plaquetas e diminuição do estresse oxidativo em ratos (GUIHENEUF et al., 2010).

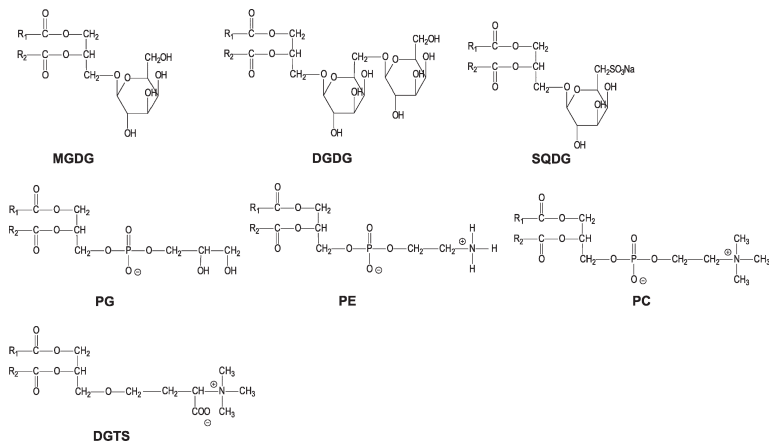
A maioria desses ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa junto com outros C16 e C18 exerce um papel estrutural fazendo parte dos glicerolípídios das membranas celulares, principalmente nos sistemas de membranas dos plastídios (GOSS; WILHELM, 2009).

Dentre as classes dos glicerolipídios em microalgas, podem-se destacar os fosfolipídios – Fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) –, galactolipídios – monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) e digalactosil-diacilglicerol (DGDG) e sulfolipídios – Sulfoquinovosil-diacilglicerol (SQDG) (Figura 5). Enquanto os fosfolipídios encontram-se distribuídos em diversos compartimentos celulares, MGDG, DGDG e SQDG estão restritos às membranas dos tilacoides no cloroplasto. Outro lipídio encontrado nesse compartimento, particularmente em algas verdes, é o Diacilglicerol-trimetil-homoserina (DGTS), o qual substitui PC em microalgas marinhas onde o ambiente é sabidamente pobre em fósforo dissolvido (GOSS; WILHELM, 2009).

De fato, o nível de insaturação dos lipídios de membrana contribui significativamente para sua conformação e, por conseguinte, sua fluidez (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016). Essas mudanças nos teores de insaturação dos glicerolipídios do cloroplasto são críticos para o correto funcionamento dos complexos coletores de luz e também para os fotossistemas, prevenindo fotoinibição em baixas temperaturas, por exemplo (DÖRMANN, 2005).

Em ambientes de condições extremas, como as regiões polares, microalgas extremófilas enfrentam temperaturas congelantes, além de estresses oxidativos, osmóticos e de radiação solar. Nesses organismos, especialmente naqueles adaptados a baixas temperaturas e irradiâncias, os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa exercem uma função de proteção de membranas, mantendo um efetivo transporte de elétrons mesmo em condições tão extremas (MOCK; KROON, 2002).

Figura 5. Estruturas dos principais glicerolípídios encontrados em algas.



Retirado de Goss e Wilhelm (2009) Legenda: MGDG – monogalactosil-diacilglicerol; DGDG – digalactosil-diacilglicerol; SQDG – Sulfoquinovosil-diacilglicerol; PG – fosfatidilglicerol; PE – fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; DGTS – diacilglicerol-trimetil-homosserina.

Tendo em vista a plasticidade de vias metabólicas e diante da grande variedade de moléculas produzidas pelas microalgas, esses micro-organismos representam um recurso abundante e com um grande potencial ainda não aproveitado como matéria-prima de PUFA, cujo preço de mercado, de acordo com o grau de purificação, pode ser estimado em até algumas centenas de dólares por grama para alguns ácidos graxos de interesse (ROSENBERG et al., 2008).

Paralelamente, a utilização da biomassa de microalgas tem gerado muito interesse do ponto de vista energético pela sua possível utilização como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, razão por que muitos estudos vêm sendo realizados para tornar viável o uso de microalgas para produção de biodiesel, por exemplo. Esses trabalhos demonstram um grande potencial dos referidos micro-organismos como fonte energética renovável, de modo a exaltar sua grande produtividade de óleo por hectare quando comparados a outras fontes, como culturas de plantas oleaginosas já estabelecidas (CHISTI, 2007; HUERLIMANN et al., 2010; MATA et al., 2010).

Porém, tal produção ainda não é comercialmente viável, pois os custos de produção e separação da biomassa microalgal ainda são muito altos para competir com os baixos preços do óleo diesel e de outros combustíveis de origem fóssil, sem mencionar outras fontes renováveis

como o etanol e biodiesel de oleaginosas. A produção de biomassa microalgal deve, portanto, atender e buscar mercados de produtos de alto valor agregado como os PUFA e outras biomoléculas, já que sua venda seria suficiente para contrabalançar o elevado custo do seu cultivo (RATLEDGE; COHEN, 2008).

1.3 Diatomáceas e *Phaeodactylum tricornutum*

No grupo das microalgas, as diatomáceas (Bacillariophyceae, Heterokontophyta) merecem uma atenção especial por serem responsáveis por um quinto da fotossíntese na Terra e têm sido reconhecidas como um dos produtores primários dominantes nos oceanos. São consideradas também um grupo abundante e com grande diversidade – mais de cem mil espécies estimadas –, o que demonstra o seu sucesso evolutivo (FIELD et al., 1998; ARMBRUST, 2009; BOWLER et al., 2010; HILDEBRAND et al., 2012).

Dos milhares de espécies existentes, destacam-se algumas como *Thalassiosira fluviatilis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia* spp. e *Chaetoceros* spp. devido ao seu potencial biotecnológico, uso como alimento vivo em sistemas aquícolas, estudos de fisiologia vegetal, estudos de impacto ambiental, entre outros (BOROWITZKA, 1992; 1997; HILDEBRAND et al., 2012).

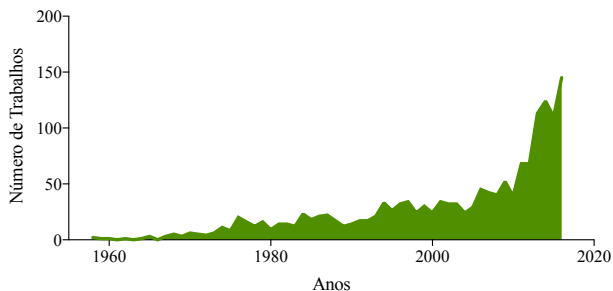
Dentre as supramencionadas espécies, *P. tricornutum* é uma diatomácea penada marinha que tem sido usada extensivamente em estudos fisiológicos e bioquímicos, e tem servido como fonte de alimento vivo em sistemas de aquicultura há algumas décadas devido à facilidade de seu cultivo e composição nutricional, embora sua distribuição na natureza não seja considerada ampla (DE MARTINO et al., 2007).

Na Figura 6, de acordo com base de dados SCOPUS (www.scopus.com), estão relacionados os estudos envolvendo essa microalga nos últimos 58 anos, totalizando 1256 trabalhos científicos, dos quais cerca de metade foi publicado somente na última década.

Esse interesse da comunidade científica por *P. tricornutum* pode ser explicado pela facilidade de seu cultivo em determinadas condições. Por exemplo, em alguns centros de aquicultura da década de 1960, a presença dessa espécie era considerada um problema, pois, por se tratar de uma microalga com rápido crescimento, acabava por contaminar e dominar os tanques de cultivo de outras espécies de interesse como *T. pseudonana*. Essa “robustez” é parcialmente explicada por algumas características fenotípicas como a alta taxa de crescimento, o melhor

aproveitamento dos nutrientes, a produção de substâncias alelopáticas, a plasticidade do mecanismo fotossintético para se desenvolver em baixas irradiâncias, além de ser uma diatomácea sílica-facultativa, entre outras (COUGHLAN, 1962; ANSELL et al., 1964; DELIA et al., 1979; NELSON et al., 1979).

Figura 6. Número de trabalhos científicos publicados em periódicos indexados com *P. tricornutum* entre 1958 e 2016.



Retirado da base de dados Scopus (www.scopus.com).

Com um fenótipo de rápido crescimento aliado às características bioquímicas de sua biomassa, *P. tricornutum* tem se mostrado uma excelente candidata para aplicações biotecnológicas, principalmente como fonte alternativa à produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, em especial de EPA (CARTENS et al., 1996).

Essa microalga acumula naturalmente EPA – 19 a 40% do total de ácidos graxos da biomassa seca – e diversos estudos vêm tentando otimizar a produção de EPA através de cultivos em fotobiorreatores, nos modos autotróficos ou mixotróficos, e até mesmo fazendo uso de efluentes dos mais variados. Na Tabela 1, podem ser encontrados alguns trabalhos sobre a produção de EPA por *P. tricornutum*, o que demonstra o interesse biotecnológico no cultivo desta microalga como fonte de PUFA ω -3.

Tabela 1. Exemplos de trabalhos sobre a produção de EPA em *P. tricornutum*

Trabalhos	Tipo Cultivo	Fase do Cultivo	Dias	Concentração EPA (% AG total)
SIRON et al. (1989)	A/Batelada	Fase log	3	10
	A/Batelada	Fase log	5	21,3
	A/Batelada	Fase Estacionária	12	14,3
	A/Batelada c/ Ortofosfato	Fase log	7	26,8
YONGMANITCHAI; WARD (1991)	A/Batelada	Fase log	6	32,5
	A/Contínuo	ND	ND	35
YONGMANITCHAI; WARD (1992)	A/Batelada c/ Nitrato	Fase log	7	28,6
	A/Batelada c/ Amônia	Fase log	7	10,1
	A/Batelada c/ Uréia	Fase log	7	29,1
	A/Batelada c/ Fosfato	Fase log	7	28,4
CARTENS et al. (1996)	A/Contínuo	ND	ND	30,5
REIS et al. (1996)	A/Contínuo	ND	ND	27,3
OTERO et al. (1997)	A/Semicontínuo	ND	ND	25
VAZHAPPILLY; CHEN (1997)	A/Batelada	Final Fase log	10	21,7
MEISER et al. (2004)	A/Batelada	ND	ND	33
GARCIA et al. (2005)	A/Batelada	ND	8	1,6 (*)
	M/Batelada Alimentada c/ Frutose	ND	25	1,59 (*)
	M/Batelada Alimentada c/ Glicerol	ND	41	2,4 (*)

Legenda: A – Cultivo Autotrófico. M – Cultivo Mixotrófico. ND – Não Determinado. AG – Ácidos Graxos (*) - Dados em % do total da biomassa seca.

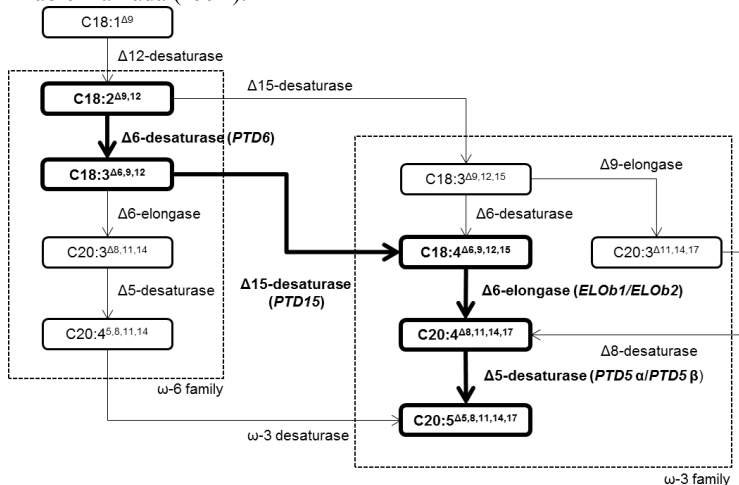
A biossíntese de EPA em *P. tricornutum* foi primeiramente descrita por Arao e Yamada (1994) através de estudos de marcação por radioisótopos (C_{14}) e dados de cromatografia gasosa, oportunidade em que foram demonstradas quatro possíveis rotas de produção desse ácido graxo (Figura 7), a partir do ácido Oléico ($C_{18:1}$). Dentre estas, a mais

ativa (Figura 7, em negrito) envolve quatro reações de oxidação, e uma reação de alongação da cadeia carbônica. Essa rota biossintética envolve ácidos graxos da família ω -6 – no caso, ácido Linoleico (LA, C18:2 $\Delta^{9,12}$) e o ácido gama-Linolênico (GLA, C18:3 $\Delta^{6,9,12}$) – e ω -3 como o ácido Estearidônico (SDA, C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) e ácido Eicosatetraenoico (ETA, C20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$), até finalmente ser oxidado ao EPA.

As reações são catalisadas por duas “front-end” desaturases ligadas à membrana, Δ 6 e Δ 5, que convertem LA em GLA e ETA em EPA, respectivamente. Outra desaturase (Δ 9) faz a conversão de OA em LA, além de uma Δ 15 desaturase, que faz a interconversão entre as duas famílias: GLA (ω -6) e SDA (ω -3). A via ainda é composta por uma elongase, que transforma SDA em ETA (MÜHLROTH et al., 2013).

Contudo, a biomassa de *P. tricornutum* comumente apresenta somente alguns dos intermediários da via de síntese de EPA, como o OA, LA e GLA. Comumente não tem se encontrado SDA e ETA nos perfis de ácidos graxos dessa microalga, o que demonstra um deslocamento dessa via para o acúmulo de EPA (YANG et al., 2014).

Figura 7. Possíveis vias de síntese de EPA em *P. tricornutum* de acordo com Arao e Yamada (1994).



Linhas em negrito indicam a rota mais ativa. Ácidos graxos ω -9: Ácido (C18:1 Δ^9). Ácidos graxos ω -6: Ácido Linoleico (C18:2 $\Delta^{9,12}$); Ácido γ -Linolênico (C18:3 $\Delta^{6,9,12}$); Ácido Di-homo- γ -linolênico (C20:3 $\Delta^{8,11,14}$); Ácido Araquidônico (C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$). Ácidos graxos ω -3: Ácido α -Linolênico (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$); Ácido Estearidônico (C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$); Ácido Eicosatrienoico (C20:3 $\Delta^{11,14,17}$); Ácido Eicosatetraenoico (C20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$); Ácido Eicosapentaenoico (C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$).

Com exceção da primeira desaturase, essas enzimas encontram-se ligadas à membrana do Retículo Endoplasmático (RE), onde ocorre a biossíntese de EPA. Contudo, é necessário que o OA – sintetizado a partir do ácido Esteárico (C18:0) – seja transportado do estroma do cloroplasto até o RE, conjugado a um glicerolípido como PC, por exemplo. Essas estruturas comumente possuem duas posições para a incorporação dos radicais: *sn-1* e *sn-2*, sendo que a primeira está ligada ao OA. Uma vez sintetizado, o EPA é transportado ao plastídio onde pode ser associado aos diferentes tipos de glicerolípidios próprios do cloroplasto (MÜHLROTH et al., 2013).

Em *P. tricornutum*, o EPA é o ácido graxo predominante nas formas de MGDG de plastídios juntamente com os ácidos Palmitoléico (C16:1^{Δ9}) e Hexadecatrienoico (C16:3^{Δ6,9,12}). De fato, a espécie mais comum desse glicolípido é C20:5/C16:X-MGDG. Em relação aos outros dois glicerolípidios mais comuns em membranas do cloroplasto, DGDG e SQDG, EPA ainda é encontrado, porém em menor proporção, já que essas estruturas são comumente mais saturadas. Ainda pode-se citar que o EPA é o ácido graxo de maior prevalência em fosfolípidios como PG e PC, tanto nos plastídios quanto em outros sistemas de membranas celulares (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016).

Alguns fatores ambientais sabidamente influenciam os teores de EPA na biomassa de *P. tricornutum*. Por exemplo, Siron et al. (1989) demonstraram que a disponibilidade de um nutriente, fósforo, afetava significativamente a concentração do PUFA, onde, após sete dias de cultivo, o meio suplementado e o meio deficiente de ortofosfato apresentaram valores de EPA de 26% e 6,9% do total de ácidos graxos da biomassa, respectivamente.

Além da presença do nutriente, a concentração de fósforo também impactou os níveis de EPA em *P. tricornutum*. Yongmanitchai e Ward (1991) observaram que quando a concentração de ortofosfato do meio de cultura foi dobrada (de 0,05 para 0,1 g L⁻¹), resultou em um aumento significativo na concentração de EPA, passando de 20,1 para 27,1% do total de ácidos graxos.

A concentração de EPA também pode ser influenciada com a mudança na fase de cultivo, mais precisamente na passagem da fase exponencial para a fase estacionária. Os níveis de EPA são bastante distintos entre essas duas fases, por exemplo, podendo alcançar 21% do total de ácidos graxos na fase exponencial (quinto dia de cultivo) contra somente 4% na fase estacionária (décimo sétimo dia cultivo) (SIRON et al., 1989). Em outro trabalho, Yang et al. (2014) mostraram que *P.*

tricornutum acumulava 20,33% de EPA na fase exponencial e um pouco mais da metade desse valor, 11,67%, na fase estacionária.

Em outro estudo, foi avaliada a influência de algumas condições de cultivo variando: salinidade, irradiância, temperatura, fase de cultivo e concentração de nitrogênio, tanto na composição quanto na razão DHA/EPA em *P. tricornutum*. Os valores de EPA na biomassa sofreram alterações frente às variáveis temperatura, fase de cultivo e concentração de nitrogênio, porém sem mudanças significativas nos teores desse ácido graxo em relação às variações na salinidade e aumento da irradiância (QIAO et al., 2016).

Entretanto, com todo o conhecimento sobre o cultivo de *P. tricornutum* para produção de biomassa e EPA, ainda não existem cultivos com fins comerciais que ultrapassem uma escala laboratorial de cultivo. Tendo em vista esse cenário, uma estratégia que vem sido discutida em sistemas de cultivo de microalgas com potencial biotecnológico seria a aplicação do conceito de biorrefinaria. Ou seja, utilizar o potencial desses micro-organismos em produzir diferentes compostos de alto valor agregado e separá-los a partir de algumas frações da biomassa (CHEW et al., 2017).

No caso de *P. tricornutum*, para que o conceito de biorrefinaria possa ser aplicado, outros biocompostos com alto valor de mercado e potencial biotecnológico devem ser coproduzidos juntamente com o EPA.

Dentre os potenciais coprodutos dessa microalga pode-se citar o carotenoide fucoxantina (FX), principal pigmento acessório de plastídios de diatomáceas, com função na captação de fótons e transferência de energia para o fotossistema II (PSII). Esse pigmento pode alcançar concentrações de até 15 mg.g⁻¹ de biomassa em certas condições de cultivo, sendo que FX está ligado a diversas proteínas e moléculas de clorofila *a*, formando complexos proteína-pigmentos nos tilacoides (KIM et al., 2012; MIMOUNI et al., 2012).

Esse carotenoide apresenta um grande potencial biotecnológico, pois seu uso tem sido associado à prevenção e tratamento de alguns tipos de câncer em seres humanos. A fucoxantina juntamente com o seu metabólito, o fucoxantanol, atuam em diversas vias metabólicas das células neoplásicas, afetando a sua viabilidade através do desencadeamento de cascatas apoptóticas e autofágicas, por exemplo (MARTIN, 2015). É sabido que as respostas preventivas e antiproliferativas associadas à FX são mediadas através de diferentes vias de sinalização como caspases, proteínas Bcl-2, MAPK, JAK/STAT, entre outras (KUMAR et al., 2013).

Uma vez que *P. tricornutum* acumula naturalmente essas duas biomoléculas de grande interesse e potencial biotecnológico, além de serem ambas extraídas da fração apolar da biomassa, essa microalga é uma candidata onde o conceito de biorrefinaria poderia ser aplicado. De fato, de um ponto de vista econômico, Ruiz et al. (2016) avaliaram o mercado atual de diversos componentes da biomassa microalgal e constataram que tanto os lipídios quanto os pigmentos apresentavam os maiores preços de mercado, principalmente na indústria alimentícia, como aditivos alimentares, e indústria cosmética.

1.4 *Phaeodactylum tricornutum* e Biologia Molecular

Nos últimos anos, apesar da importância das diatomáceas como base da cadeia trófica e sua relevância ecológica, tem-se buscado mais informações sobre os aspectos moleculares por trás do seu sucesso. Para tentar elucidar algumas dessas questões, há um esforço para melhor entender como estão arrançados seus genomas, através de montagem de bibliotecas gênicas, bancos de ESTs (do inglês, Expression Sequence Tags), sequenciamento completo, entre outros (FALCIATORE; BOWLER, 2002; PARKER et al., 2008; BOWLER et al., 2010).

Nesse cenário molecular, a produção dos PUFA ω -3 de cadeia longa por *P. tricornutum* tem sido estudada através de ferramentas moleculares, a fim de tentar elucidar e otimizar sua rota metabólica de biossíntese. Foram desenvolvidos sistemas de transformação e expressão gênica específicos para essa microalga, com o desenvolvimento de vetores de clonagem, genes-repórter, marcadores moleculares, entre outros (APT et al., 1996; FALCIATORE et al., 1999; ZASLAVSKAIA et al., 2000).

Por exemplo, Zaslavskaja et al. (2001) utilizaram uma simples transformação com transportadores de glicose humanos (*GLUTs*) em *P. tricornutum*, para que essa diatomácea, um organismo fotoautotrófico obrigatório, passasse a crescer de maneira exclusivamente heterotrófica e consumisse glicose sem nenhuma fonte de iluminação.

Até mesmo a rota de síntese de EPA por essa microalga já foi estudada em um nível molecular. Duas desaturases finais dessa via foram caracterizadas através de vetores de clonagem e de uma biblioteca de cDNA, utilizando um sistema de expressão heteróloga em eucariotos (*S. cerevisiae*) (DOMERGUE et al., 2002).

Em 2008, foi publicado o genoma dessa microalga – na época, somente o segundo genoma de diatomáceas conhecido, antecedido apenas pelo genoma de *T. pseudonana* (ARMBRUST et al., 2004) – o

que resultou na ampliação do leque de possibilidades para estudos de biologia molecular, em especial no que tange à produção de EPA e/ou outros ácidos graxos (BOWLER et al., 2008).

Com as informações sobre o genoma da microalga, passaram a surgir trabalhos de engenharia genética mais específicos, como a manipulação do tamanho da cadeia carbônica de ácidos graxos em *P. tricornutum* (RADAKOVITS et al., 2011) e outro estudo que demonstrou o uso da ferramenta de silenciamento gênico por RNA de interferência nessa microalga (DE RISO et al., 2009).

Mais recentemente, Hamilton et al. (2014) manipularam geneticamente *P. tricornutum*, que passou a expressar uma elongase $\Delta 5$ de *Ostreococcus tauri* de maneira heteróloga, o que possibilitou que a cepa transgênica produzisse oito vezes mais DHA do que a cepa selvagem. Ainda no mesmo estudo, os autores utilizaram outra estratégia de transformação mediante à utilização da coexpressão de uma desaturase $\Delta 6$ acil-CoA dependente mais uma elongase $\Delta 5$, ambas derivadas de *O. tauri*, o que acarretou em um aumento ainda mais significativo nos níveis de DHA da biomassa de *P. tricornutum*.

Com o passar dos anos e dada a importância de *P. tricornutum*, novas estratégias vêm surgindo a fim de facilitar a manipulação genética dessa diatomácea, como por exemplo o uso de TALE (do inglês, Transcription Activator-Like Effector, efetores similares a ativadores de transcrição), o qual consiste no uso de nucleases e meganucleases em modificações pontuais e estáveis no genoma da microalga. Resumidamente, essas enzimas funcionariam como “tesouras” moleculares para gerar quebras na dupla fita de DNA, que a partir de dois mecanismos de reparo de DNA levariam a um rompimento de genes alvo, ou à recombinação homóloga, de maneira a permitir a integração genômica de sequências de interesse (DABOUSSI et al., 2014).

Por outro lado, outro trabalho preocupou-se no desenvolvimento de uma técnica mais confiável de transformação de *P. tricornutum*. Foi então desenvolvida uma estratégia mais estável e menos randômica de inserção de sequências de interesse no genoma da microalga, que consiste em utilizar vetores episomais específicos para diatomáceas – com comportamento de replicação bastante similar aos cromossomos da microalga – e uma metodologia de envio do plasmídeo através dos sistemas de conjugação derivados de *Escherichia coli* (KARAS et al., 2015).

Ainda em relação às modificações genéticas em *P. tricornutum*, tem se buscado vetores de expressão mais específicos para essa

microalga, os quais utilizam regiões promotoras homólogas ao próprio organismo. Recentemente, foram identificadas e clonadas duas possíveis regiões promotoras do gene que codifica para uma Glutamina sintetase – proteína abundante na fase estacionária de crescimento – utilizando sistemas repórter contendo *eGFP* (do inglês, enhanced Green Fluorescent Protein). Essa construção resultou em valores de expressão constitutiva *eGFP* 4 vezes superior a outros vetores que utilizam promotores *fcpA* (do inglês, fucoxanthin chlorophyll a/c binding protein A), por exemplo (ERDENE-OCHIR et al., 2016).

Em outro trabalho na busca de promotores próprios para sistemas de expressão em *P. tricornutum*, foi desenvolvido um novo vetor contendo a região promotora de uma fosfatase alcalina da própria microalga, o que resultou em um sistema de expressão facilmente modulável através da concentração de ortofosfato do meio de cultura. Segundo os autores, essa construção não interferiria no crescimento microalgal das células transformadas, e uma vez em condições favoráveis, produziriam altas concentrações de proteínas recombinantes (LIN et al., 2017).

Além de estudos de engenharia genética e construção de vetores de clonagem em *P. tricornutum*, outros artigos vêm focando na análise de expressão gênica de certas vias ou de uma maneira global frente a determinadas condições de cultivo.

Por exemplo, Valenzuela et al. (2012) relacionaram os perfis de expressão gênica de *P. tricornutum* com uma privação nutricional (falta de nitrogênio) e conseqüente acumulação lipídica, o que demonstrou a regulação positiva de alguns genes da via de biossíntese dos ácidos graxos dessa microalga, dentre outras rotas.

Já Yang et al. (2014) utilizaram uma análise de RNA-Seq – Sequenciamento total do RNA, ou WTSS, do inglês Whole Transcriptome Shotgun Sequencing – a fim de identificar genes de vias metabólicas que têm sua expressão modulada por um estresse nutricional ocasionado pela privação de nitrogênio no cultivo.

Em outro trabalho envolvendo RNA-Seq, foi analisado o transcriptoma de *P. tricornutum* frente às flutuações nas concentrações de outro nutriente essencial à microalga – o ortofosfato. Esse estudo reportou genes previamente não identificados e altamente responsivos ao estresse pela depleção de fósforo no meio de cultivo. Por último, também foram encontrados moléculas de RNA intergênicas (não codificantes), as quais poderiam exercer um papel regulatório na homeostase nas concentrações de ortofosfato celular (CARVALHO et al., 2016).

Smith et al. (2016) apresentaram dados do transcriptoma, além de resultados de composição metabólica e fisiológica de *P. tricornutum* frente a diferentes concentrações de ferro dissolvido durante ciclos claro-escuro. Com isso pretendeu-se compreender melhor os aspectos de controle gênico na aclimação fisiológica durante uma limitação de ferro no meio de cultura. De acordo com os autores, essa análise global possibilitou uma ampliação no rol de genes envolvidos frente a baixas concentrações de ferro.

Outros artigos vêm focando em estudos de Proteômica em *P. tricornutum* face a determinadas condições estressantes, a fim de se observar e identificar quais proteínas têm sua expressão modulada por um estresse nutricional específico, como por exemplo a falta de fósforo no meio de cultivo (CHEN et al., 2014).

Além dos inúmeros trabalhos envolvendo componentes de genética molecular e “omics” em *P. tricornutum*, essa microalga tem despertado interesse nas áreas de biologia celular, mais precisamente em análises da ultraestrutura, identificação de compartimentos intracelulares, citolocalização de organelas e tráfico intermembranas de proteínas (RAST et al., 2015).

Por exemplo, por *P. tricornutum* se tratar de uma diatomácea, organismos fotossintéticos derivados de uma endossimbiose secundária, essa microalga tem se destacado em estudos de mecanismos de importação de proteínas em plastídios (organela cercada por quatro membranas). Liu et al. (2016) desenvolveram sistemas de proteínas marcadoras, as quais podem auxiliar na identificação de compartimentos subcelulares do intricado sistema de membranas do cloroplasto dessa microalga.

Ainda em relação à questão da complexidade dos plastídios em *P. tricornutum*, Fiori et al. (2016) identificaram no compartimento periplastidial – citoplasma residual do endossimbionte – a presença de um sistema vesicular, através de técnicas de microscopia eletrônica de escaneamento por feixe de íons focalizado. De acordo com o autores, um melhor entendimento sobre esse compartimento abre novas perspectivas para se compreender a origem secundária dos plastídios em diatomáceas, além de sua biogênese e relacionamento com outros compartimentos celulares.

1.5 Referências Bibliográficas

ANSELL, A. D. et al. Studies on the mass culture of *Phaeodactylum*. 4. Production and nutrient utilization in outdoor mass culture. **Limnology and Oceanography**, v. 9, n. 3, p. 334-342, 1964.

APT, K. E. et al. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Molecular & General Genetics**, v. 252, n. 5, p. 572-579, 1996.

ARAO, T.; YAMADA, M. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1177-1181, 1994.

ARMBRUST, E. V. The life of diatoms in the world's oceans. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 185-192, 2009.

ARMBRUST, E. V. et al. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. **Science**, v. 306, n. 5693, p. 79-86, 2004.

BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and processes – matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, n. 3, p. 267-279, 1992.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 1, p. 3-15, 1995.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 5, p. 393-401, 1997.

BOWLER, C. et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 239-244, 2008.

BOWLER, C. et al. Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. **Annual Review of Marine Science**, v. 2, n. 1, p. 333-365, 2010.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BROWER, V. Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 728-731, 1998.

CARTENS, M. et al. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 8, p. 1025-1031, 1996.

CARVALHO, M. H. C. et al. Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations. **New Phytologist**, n. 210, p. 497-510, 2016.

CHEN, Z. et al. Phosphoproteomic analysis provides novel insights into stress responses in *Phaeodactylum tricorutum*, a model diatom. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 5, p. 2511-2523, 2014.

CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, n. 229, p. 53-62, 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

COUGHLAN, J. Chain Formation by *Phaeodactylum*. **Nature**, v. 195, n. 4843, p. 831-840, 1962.

DABOUSSI, F. et al. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology. **Nature Communications**, v. 5, p. 1-7 2014.

DE MARTINO, A. et al. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) accessions. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 5, p. 992-1009, 2007.

DE RISO, V. et al. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 14, p. 1-12, 2009.

DECKELBAUM, R. J.; TORREJON, C. The omega-3 fatty acid nutritional landscape: Health benefits and sources. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 587-591, 2012.

DELIA, C. F. et al. Growth and competition of the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. 1. Nutrient effects. **Marine Biology**, v. 50, n. 4, p. 305-312, 1979.

DOMERGUE, F. et al. Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 16, p. 4105-4113, 2002.

DÖRMANN, P. Membrane Lipids. In: MURPHY, D. (Ed.). **Plant Lipids. Biology, utilization and manipulation**. Oxford: Blackwell Publishing, CRC Press, 2005. p.123-160.

ERDENE-OCHIR, E. et al. Cloning of a novel endogenous promoter for foreign gene expression in *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biological Chemistry**, v. 6, n. 59, p. 861-867, 2016.

ESPÍN, J. C. et al. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2986-3008, 2007.

FALCIATORE, A.; BOWLER, C. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 109-130, 2002.

FALCIATORE, A. et al. Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. **Marine Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 239-251, 1999.

FIELD, C. B. et al. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. **Science**, v. 281, n. 5374, p. 237-240, 1998.

FIORI, S. et al. Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Protist**, v. 167, p. 254-267, 2016.

GARCIA, M. C. C. et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* - Influence of different nitrogen and organic

- carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 297-305, 2005.
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids .1. Occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 10, p. 401-409, 1997.
- GOSS, R.; WILHELM, C. Lipids in Algae, Lichens and Mosses. In: WADA, H. e MURATA, N. (Ed.). **Lipids in Photosynthesis: Essential and regulatory functions** Netherlands: Springer Science, v.30, 2009. cap. 6, p.117-135.
- GUIHENEUF, F. et al. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 5, p. 629-638, 2010.
- HAMILTON, M. L. et al. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricorutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Metabolic Engineering**, v. 22, p. 3-9, 2014.
- HILDEBRAND, M. et al. The place of diatoms in the biofuels industry. **Biofuels**, v. 3, n. 2, p. 221-240, 2012.
- HUERLIMANN, R. et al. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 245-257, 2010.
- HULBERT, A. J.; ABBOTT, S. K. Nutritional ecology of essential fatty acids: an evolutionary perspective. **Australian Journal of Zoology**, v. 59, n. 6, p. 369, 2011.
- ISKANDAROV, U. et al. Identification and characterization of delta 12, delta 6, and delta 5 desaturases from the green microalga *Parietochloris incisa*. **Lipids**, v. 45, n. 6, p. 519-530, 2010.
- KALRA, E. K. Nutraceutical – definition and introduction. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 3, p. 1-2, 2003.
- KARAS, B. J. et al. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-10, 2015.

KARR, J. E. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition throughout the lifespan: A review. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 216-225, 2011.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 91-100, 2011.

KHOZIN-GOLDBERG, I. et al. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 905-915, 2011.

KHOZIN-GOLDBERG, I. et al. Microalgae as a source for VLC-PUFA production. In: NAKAMURA, Y. e LI-BEISSON, Y. (Ed.). **Lipids in plant and algae development**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. cap. 19, p.471-510. (Subcellular Biochemistry).

KIM, S. M. et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 166, p. 1843-1855, 2012.

KUMAR, S. R. et al. Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. **Marine Drugs**, v. 11, p. 5130-5147, 2013.

LEE, R. E. **Phycology**. 4th. Cambridge, England ; New York: Cambridge University Press, 2008. 547 p.

LIN, H. Y. et al. Alkaline phosphatase promoter as an efficient driving element for exogenic recombinant in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Algal Research**, v. 23, p. 58-65, 2017.

LIU, X. et al. Addressing various compartments of the diatom model organism *Phaeodactylum tricornutum* via sub-cellular marker proteins. **Algal Research**, v. 20, p. 249-257, 2016.

LUCHTMAN, D. W.; SONG, C. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from childhood to old age: Findings from animal and clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 550-565, 2013.

MARTIN, L. J. Fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol in cancer prevention and treatment. **Marine Drugs**, v. 13, p. 4784-4798, 2015.

MATA, T. M. et al. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MEISER, A. et al. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 3, p. 215-225, 2004.

MEYER, A. et al. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 1899-1909, 2004.

MIMOUNI, V. et al. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 15, p. 2733-2750, 2012.

MOCK, T.; KROON, B. M. A. Photosynthetic energy conversion under extreme conditions — II: The significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms. **Phytochemistry**, v. 61, p. 53-60, 2002.

MÜHLROTH, A. et al. Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. **Marine Drugs**, v. 11, n. 11, p. 4662-4697, 2013.

NELSON, D. M. et al. growth and competition of the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. 2. Light limitation. **Marine Biology**, v. 50, n. 4, p. 313-318, 1979.

NICHOLS, P. D. et al. Long-chain Omega-3 oils – An update on sustainable sources. **Nutrients**, v. 2, n. 6, p. 572-585, 2010.

NISHIDA, C. et al. The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. **Public Health Nutrition**, v. 7, n.1a, 2007.

OTERO, A. et al. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 5, p. 465-469, 1997.

PARKER, M. S. et al. Genomic insights into marine microalgae. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 619-645, 2008.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

QIAO, H. et al. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. **Aquaculture**, v. 452, p. 311-317, 2016.

RADAKOVITS, R. et al. Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum*. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 1, p. 89-95, 2011.

RAST, A. et al. Biogenesis of thylakoid membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta**, n. 1847, p. 821-830, 2015.

RATLEDGE, C.; COHEN, Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? **Lipid Technology**, v. 20, n. 7, p. 155-160, 2008.

REIS, A. et al. Eicosapentaenoic acid-rich biomass production by the microalga *Phaeodactylum tricornutum* in a continuous-flow reactor. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 83-88, 1996.

ROSENBERG, J. N. et al. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 430-436, 2008.

RUIZ, J. et al. Towards industrial products from microalgae. **Energy & Environmental Science**, v. 9, p. 3036-3043, 2016.

RUXTON, C. H. et al. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **J Hum Nutr Diet**, v. 17, n. 5, p. 449-59, 2004.

SATYANARAYANA, K. G. et al. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, v. 35, n. 4, p. 291-311, 2011.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 438-463, 1991.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SIRON, R. et al. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 55, n. 1, p. 95-100, 1989.

SMITH, S. R. et al. Transcriptional orchestration of the global cellular response of a model pennate diatom to diel light cycling under Iron limitation. **Plos Genetics**, p. 1-39, 2016.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

SWANSON, D. et al. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2012.

TOCHER, D. R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 717-732, 2010.

TUR, J. A. et al. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. S23-S52, 2012.

VALENZUELA, J. et al. Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.

VAZHAPPILLY, R.; CHEN, F. Eicosapentaenoic acid production by microalgae under photoautotrophic and heterotrophic conditions of growth. **Phycologia**, v. 36, n. 4, p. 117-117, 1997.

WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3627-3652, 2005.

YANG, Z. K. et al. Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1793-1807, 2014.

YASHODHARA, B. M. et al. Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 85, n. 1000, p. 84-90, 2009.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. Growth of and Omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 419-425, 1991.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. Growth and eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in batch and continuous culture systems. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 69, n. 6, p. 584-590, 1992.

ZASLAVSKAIA, L. A. et al. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 2, p. 379-386, 2000.

ZASLAVSKAIA, L. A. et al. Trophic obligate conversion of an photoautotrophic organism through metabolic engineering. **Science**, v. 292, n. 5524, p. 2073-2075, 2001.

ZEISEL, S. H. Regulation of "nutraceuticals". **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1853-1855, 1999.

2 Justificativa

A diatomácea *Phaeodactylum tricorutum* pode acumular concentrações elevadas de EPA em sua biomassa, sendo que esse fenótipo já é bem caracterizado na literatura, assim como as condições de cultivo necessárias, as quais podem levar a uma maior produção desse ácido graxo poli-insaturado. Porém, ainda não está claro como tais aspectos ecofisiológicos poderiam influenciar a biossíntese de EPA em um nível molecular, mais precisamente na transcrição dos genes associados a essa rota metabólica.

Portanto, fazem-se necessários estudos mais específicos que visam correlacionar as condições de cultivo aos padrões de transcrição das desaturases e elongases que fazem parte da via de síntese de EPA em *P. tricorutum*.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Analisar a influência de determinados contextos ecofisiológicos na biossíntese do ácido Eicosapentaenoico em um nível molecular, mais precisamente nos perfis de transcrição dos genes associados.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Determinar o impacto de diferentes concentrações de ortofosfato e fases de crescimento no perfil de transcrição gênica da biossíntese e concentração de EPA na biomassa de *P. tricorutum* (Artigo 1).

3.2.2. Quantificar a influência de diferentes regimes de iluminação (fotoperíodo) no teor de pigmentos e no perfil de transcrição gênica da biossíntese de EPA em *P. tricorutum* (Artigo 2).

4 Artigo 1

Formatado de acordo com o Journal of Basic Microbiology. Submetido.
(ISSN: 1521-4028, IF: 1,585 , Qualis B2, Área Biotecnologia).

Influence of phosphorus and growth phases on the transcription levels of EPA biosynthesis genes in *Phaeodactylum tricorutum*.

Rafael Garcia Lopes^{1, 2*}, Jacó Joaquim Mattos³, Maria Risoleta Freire Marques³, Aline Terra Soares⁴, Magaly Córdoba Garcés⁴, Nelson Roberto Antoniosi Filho⁴, Roberto Bianchini Derner¹, Leonardo Rubi Rörig².

¹ Laboratory of Algae Cultivation, Department of Aquaculture, Center of Agrarian Sciences. Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

² Laboratory of Phycology, Department of Botany, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

³ Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry, Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁴ Laboratory of Extraction and Separation Methods, Institute of Chemistry, Federal University of Goias, Goiania, Brazil.

Keywords: Microalgae, desaturases, N/P ratios, fatty acid biosynthesis, gene expression.

***Corresponding author.** E-mail: rafael.lopes@ufsc.br. Phone number: +55 048 3721-4106/ +55 048 98404-9519. Address: Rua Beco dos Coroas, 503, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. CEP: 88061-600.

4.1 Introduction

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are considered essential in animal diet because these organisms can synthesize monounsaturated and saturated fatty acids from non-lipidic sources but cannot generate PUFAs *de novo* [1].

The two major PUFA families with active biological functions, the ω -3 and ω -6, are both important in mammalian diet; mammals are unable to interconvert one family into another and therefore require a balanced ingestion of both classes [2]. Because of its importance, the World Health Organization (WHO) began to recommend PUFA ingestion regularly since 1989. In 2002, WHO established a daily energetic consumption goal of 5-8% ω -6 PUFAs and 1-2% ω -3 PUFAs [3].

In the ω -3 family, Eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}) and Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 ^{Δ 4,7,10,13,16,19}) have an important role in human and animal health. Both acids are important because they play roles in visual development, enhance cognitive and learning abilities [4], serve as cardiovascular protectors, provide templates for the production of eicosanoids that are related to inflammatory and immunogenic processes [2, 5], and diminish depression risks and age related neurological degeneration [6].

Currently, the source of these fatty acids (by direct or indirect consumption) is seafood – fish, mollusks and crustaceans – notably from temperate or colder waters. However, the contamination and sustainability of these stocks and their environments raise concerns regarding the supply for the growing consumer market [7].

Microalgae biomass can potentially serve as an alternative source of PUFAs because these microorganisms are natural PUFA producers and can be easily cultivated [8]. Regarding the ω -3 family, EPA and DHA are relatively abundant in marine microalgae, notably diatoms, a characteristic already exploited in many aquaculture-rearing systems [9].

One diatom, *Phaeodactylum tricornutum*, has been investigated in physiological and biochemical studies over several decades because it naturally accumulates 19 to 40% EPA of total fatty acid content. The growth of *P. tricornutum* for biomass and EPA production was previously investigated in a range of experiments, from milliliters to thousands of liters; in open ponds or photobioreactors; in autotrophic or mixotrophic cultivation modes, among other relevant cultivation information [10-13].

In this scenario, the major environmental factors that affect EPA levels in *P. tricornutum* biomass are well established. For an example, Siron, Giusti [14] showed that the phosphorus availability significantly affects the EPA concentration, in which a comparison between phosphorus supplemented medium and phosphorus deficient medium after seven days of cultivation presented EPA concentrations of 26% and 6.9%, respectively.

However, the concentration in addition to the presence of phosphorus directly influences the EPA levels. Yongmanitchai and Ward [10] demonstrated a shift in EPA concentration by increasing orthophosphate level twofold in culture medium, 0.05 to 0.1 g L⁻¹, resulting in an EPA increment from 20.1 to 27.1% of the total fatty acids.

Another example of environmental factors affecting EPA concentration is the shift in cultivation phase, more precisely between the exponential and stationary phases. EPA levels were distinct between these two phases, reaching 21% of total fatty acids in the exponential phase (fifth cultivation day) and only 4% in the stationary phase after 17 days of cultivation [14]. In another study, Yang, Niu [15] showed that *P. tricornutum* accumulated 20.33% EPA of the total fatty acids in the exponential phase and 11.67% in the stationary phase.

These shifts in nutrient concentrations and cultivation phases could be modulating the EPA biosynthesis pathway, as described by Arao and Yamada [16]. Using gas chromatography and radioisotope labeling chase experiments, these authors revealed four possible routes starting from Oleic acid (OA, C18:1^{Δ9} ω-9), for which the most active EPA biosynthesis pathway involves four desaturation steps and one elongation step (Figure 1, highlighted in bold). First, OA is desaturated to Linoleic acid (LA, C18:2^{Δ9,12} ω-6). Then, LA is further desaturated to γ-Linolenic acid (GLA, C18:3^{Δ6,9,12} ω-6). After that, GLA is desaturated to Stearidonic acid (SDA, C18:4^{Δ6,9,12,15} ω-3). SDA then is elongated to Eicosatetraenoic acid (ETA, C20:5^{Δ8,11,14,17} ω-3). Finally, ETA is desaturated to EPA.

Nevertheless, the possible environment modulation of gene transcription levels involved in these elongation and desaturations steps of the EPA biosynthesis pathway remains unknown. Previously, a couple of front-end desaturases - Δ6 and Δ5 - were cloned [17]. Furthermore, since the genome of *P. tricornutum* was already sequenced [18] other putative sequences have been annotated in different databases such as DiatomCyc (<http://www.diatomcyc.org>) and the Joint Genome

Institute (JGI, <http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>). The other predicted genes in the pathway remain to be studied.

This study evaluated the influence of three nitrogen/phosphorus (N/P) ratios and the growth phases (exponential and stationary) on both the EPA concentration and gene transcription levels involved in EPA biosynthesis of the microalgae *P. tricornutum*.

4.2 Material and methods

4.2.1 Culture conditions and experimental design

The diatom *Phaeodactylum tricornutum* strain CCAP1055/1 was maintained in f/2 medium [19] plus 80 mg L⁻¹ sodium silicate in 100 mL flasks in a germination chamber with a 8:16 photoperiod at 20°C. The culture was diluted once a week for maintenance purposes.

The assay was carried out in 2 L borosilicate flasks with a 1.8 L working volume, in the same culture medium and at the same temperature but under continuous light (200 μmol m⁻² s⁻¹). The cultures were agitated with pressurized atmospheric air supplemented with 0.5% CO₂ (v/v). The experimental units were inoculated with 200 mg L⁻¹ pre-grown microalgae (7 days).

Each treatment consisted in three increasing P-PO₄⁻ concentrations (76 μM, 114 μM and 228 μM), thus giving three distinct N/P ratios (21/1, 14/1 and 7/1, respectively), with four independent replicas.

4.2.2 Growth evaluation

The cellular density was determined by direct cell counting with a Neubauer chamber (cells 10⁴ ml⁻¹) for the first four days, then every three days until the culture reached stationary phase. In parallel, biomass was estimated indirectly by absorbance readings at 700 nm with a UV-Vis spectrophotometer (Thermo), according to the equation: Biomass (g L⁻¹) = ABS700*0.0022, R² = 0.98465.

4.2.3 Nutrient analysis

To determine the concentration of dissolved nitrate and orthophosphate, culture samples (50 ml) were taken every three days until the cultures reached stationary phase. The samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes, and then the supernatant was

filtered (0.45 μm) and frozen (-20°C). The nitrate (N-NO_3) concentration was determined by the Brucine method [20], and the orthophosphate concentration (P-PO_4) was determined according to Kerouel and Aminot [21].

4.2.4 RNA purification and cDNA synthesis

Culture samples were taken according to Siaux, Heijde [22] from each experimental unit at two specific time points corresponding to exponential (third day) and stationary phases (12th day). The culture was centrifuged (2000 x g, 5 minutes), washed 1x with sterile marine water, with the pellet immediately frozen in liquid nitrogen, and later then stored at -80°C . Total RNA was purified from 10^8 cells using 1 mL of Qiazol Lysis Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Concentration was estimated at 260 nm, with purity being checked in 260/280 (>1.8) and 260/230 ratios, on a Nanodrop 1000 (Thermo).

Then, cDNA was synthesized with the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Prior to reverse transcription, 1 μg of total RNA was treated with the provided gDNA wipeout buffer for 2 min at 42°C to eliminate gDNA contamination. The cDNA concentration and purity was then checked on a Nanodrop as previously described

4.2.5 qPCR conditions/analysis

The EPA biosynthesis pathway considered was the most active route according to Arao and Yamada [16]. Primers were designed using the OligoAnalyzer software (IDT, <http://www.idtdna.com>) based on sequences of mRNAs from the DiatomCyc database (<http://www.diatomcyc.org>), and the resulting primer pairs are listed in Table 1. *PTD15*, *ELO6b1* and *ELO6b2* were putative sequences annotated, and *PTD6*, *PTD5* alpha and *PTD5* beta were previously described by Domergue, Lerchl [17].

In all experimental units qPCR reactions were performed using 100 ng template cDNA in a total reaction volume of 20 μL in duplicate. The samples were amplified using the QuantiFast[®] SYBR[®] Green PCR kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions using the Real-Time Cycler Rotor Gene Q[®] (Qiagen) and Rotor Gene 6000 Series software (Qiagen). The cycling conditions were as follows: PCR initial heat activation (95°C for 5 min); denaturation (95°C for 10 s); and

combined annealing/ extension (60 °C for 30 s) repeated for 35 cycles. After the amplification phase, the amplicons were subjected to a melt curve analysis (ramp from 72 °C to 95 °C. with 1 °C increase/step) to ensure that non-specific annealing was not occurring. In every run, duplicate negative reverse transcription controls (no gDNA buffer wipeout treatment) and blank controls (molecular biology grade water) were included. All controls did not display amplification after 35 cycles.

In each run, qPCR efficiency (E) was checked for each primer pair by constructing a standard curve from serial dilutions (1:1) with 300, 150, 75, 37.5 and 18.75 ng (in duplicates) from a pool of all cDNA samples (24). Only curves with efficiencies ranging from 99% and 101% were used, and the Rotor Gene 6000 Series software automatically calculated the E after threshold setting.

4.2.6 Relative gene transcription/expression levels

For gene transcription level normalization, *RPS* (small ribosomal subunit 30S) and *H4* (Histone) genes were used as reference genes (Table 1), according to Siau, Heijde [22]. For more robust relative expression analysis, the geometric mean of the two reference genes (Ref GM) was determined using the geNORM software. The 21/1 treatment average C_q value in the exponential phase ($E_{21/1}$, $n=4$) was used as the calibration condition (second normalization). Relative gene transcription levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method [23] in which the first normalization was $\Delta C_q (\text{sample}) = C_q (\text{sample}) - C_q (\text{Ref GM})$, and the second normalization was $\Delta\Delta C_q (\text{sample}) = \Delta C_q (\text{sample}) - \Delta C_q (E_{21/1})$. All relative expression values were presented as the fold change number relative to the transcript levels of the 21/1 treatment in the exponential phase.

4.2.7 Fatty acid methyl esters (FAME) analysis

Samples for FAME analysis were taken (400 mL) from each experimental unit at two specific time points, the 3rd and 12th days, corresponding to the exponential and stationary cultivation phases, respectively. These samples were centrifuged and washed 1x with ammonium formate. The resulting pellet was frozen (-20 °C) and later freeze-dried. The procedure of direct transesterification (DT) of *P. tricornutum* biomass FAME was performed using the Hartman & Lago method adapted to micro-scale as described by Menezes, Leles [24]. The upper organic phase containing the FAME was collected and analyzed

by gas chromatography. To calculate the ester content in the algal biomass, 1.0 mL was removed from the heptanic phase, obtained via DT and transferred to an Eppendorf® tube previously weighed. The samples were left in a desiccator for solvent evaporation until the FAME mass reached constant weight.

A Shimadzu model GC 2010 Plus gas chromatograph equipped with a Flame Ionization Detector (FID) coupled with mass spectrometer with a split/split-less injector was used to analyze the FAME composition. The capillary column was the DB-WAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). The initial temperature of the oven was 70 °C. The oven was heated at a rate of 10 °C min^{-1} to 240 °C and maintained at this temperature for 13 minutes. Then, it was heated again at a rate of 5 °C min^{-1} to 250 °C. The injector temperature was kept at 350 °C in split mode with a split ratio of 10:1 for an injection volume of 2 μL . The detector temperature was maintained at 350 °C. Helium was used as the carrier gas at a linear velocity of 42 cm s^{-1} , and nitrogen was used as the auxiliary gas at a rate of 20 mL min^{-1} . The FAMEs were identified by comparison with the retention times of samples of known composition such as soybean, peanut, and crambe (*Crambe abyssinica*) oil by analyzing FAME reference standards (Nu-Check-Prep®) and by gas chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (GC-HRMS).

4.2.8 Statistical analysis

All data points are presented as the average of each N/P ratio treatment (n=4) plus the standard deviation (SD). To compare the N/P ratios averages in the same cultivation phase, the non-parametric Kruskal-Wallis test coupled with Dun's post hoc test with a 95% significance level was used in all assays. To compare the response of the culture under identical N/P ratios in different cultivation phases, a non-parametric Mann-Whitney test with a significance level of 95% was employed. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

4.3 Results

4.3.1 Growth and nutrient assimilation

The cultures were carried out for 12 days without cellular density and biomass differences between treatments during the entire cultivation period (Fig. 2A and Fig. 2B). The average cell density was $3.4 \cdot 10^7$ cells

mL^{-1} with a biomass of 1.54 g L^{-1} at the end of cultivation with an average biomass volumetric productivity of $0.107 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for all treatments.

Nitrate assimilation was also similar in all three treatments with an average consumption of 75% of the total until the end of cultivation, corresponding to $420 \text{ }\mu\text{M}$ average residual nitrate (Fig. 2C). For experimental purposes, this nutrient did not become a limiting factor in a manner that could contribute to the phenotype (EPA concentration) and gene transcript levels, hindering the assessment of the phosphate effect on these parameters.

The three initial orthophosphate concentrations were $76 \text{ }\mu\text{M}$, $127 \text{ }\mu\text{M}$, and $229 \text{ }\mu\text{M}$, giving approximately N/P ratios of 21/1, 14/1 and 7/1, respectively. However, even with phosphorus concentrations 3 and 1.5 times higher than the control treatment (21/1), all of the orthophosphate was assimilated by the ninth cultivation day (Fig. 2D), indicating the importance of this nutrient to *P. tricornutum* cultivation.

4.3.2 Fatty acid composition analysis

FAMES detected from *P. tricornutum* are presented in Table 2. Myristic (C14:0), Palmitic (C16:0), Palmitoleic (C16:1), Hexatrienoic (C16:3), and EPA FAMES are the most representative fatty acids classes in *P. tricornutum* biomass, comprising more than 80% of the total (average of all treatments) regardless of the cultivation phase.

Palmitic, Palmitoleic, Oleic and Linoleic fatty acids are significantly ($p < 0.05$) more abundant in the stationary phase when compared to the exponential phase in at least one N/P ratio, whereas Hexatrienoic and EPA concentrations are significant higher ($p < 0.05$) in the exponential phase, without any significant ($p > 0.05$) difference between the N/P ratios. As a result, saturated (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) concentrations are higher (in average between N/P ratios) in the stationary phase (28.16% and 36.18, respectively) in comparison to the exponential phase (22.62% and 29.1%). In contrast, the polyunsaturated fatty acids levels (more than 3 unsaturated bonds, PUFA) displayed the opposite profile; the PUFA was more abundant in the exponential phase (30.4%) than the stationary phase (24.16%).

Two intermediate fatty acids from EPA biosynthesis, SDA and ETA, are both absent from the fatty acid profile of *P. tricornutum*, indicating a stringent control towards EPA production, and by the lower concentrations of other intermediates such as OA, LA and GLA, when

compared to EPA levels. Also, these two fatty acids show similar accumulation patterns, with higher levels in the stationary phase (6.35% and 3.51, respectively) in direct contrast to a drop in EPA concentration in this cultivation phase (28.64% to 21.89%), indicating a well-balanced control in EPA production.

4.3.3 Transcription levels of EPA biosynthesis pathway genes

According to Arao and Yamada [16] the most active EPA biosynthesis pathway starting with Linoleic acid (LA, C18:2^{Δ9,12}) involves three desaturation steps and one elongation step in *P. tricornutum*. First, LA is further desaturated to γ -Linolenic acid (GLA, C18:3^{Δ6,9,12}) by a Δ 15-desaturase encoded by the *PTD15* gene (putative). Then, GLA is desaturated to stearidonic acid (SDA, C18:4^{Δ6,9,12,15}) by a Δ 6-desaturase, encoded by the *PTD6* gene [17]. SDA is elongated to eicosatetraenoic acid (ETA, C20:5^{Δ8,11,14,17}) by a Δ 6-elongase encoded by the *ELO6* gene (putative). Finally, ETA is desaturated to EPA by a Δ 5-desaturase encoded by the *PTD5* gene [17]. A search through the DiatomCyc database (<http://www.diatomcyc.org>), it was possible to identify two *ELO6* genes (b1 and b2) and two *PTD5* genes (alpha and beta)

All gene transcription levels are presented in Figure 3, and three similar expression pattern groups are noted. First, genes *PTD15*, *ELO6* b2 and *PTD5* beta presented significant upregulated transcription profiles ($p < 0.05$) in the stationary phase when compared to the exponential phases in all N/P ratios without significant phosphorus concentration related gene expression modulation ($p > 0.05$) in any cultivation phase. The second group, *PTD6* and *PTD5* alpha showed significant downregulation ($p < 0.05$) between the 21/1 and 14/1 ratios in the exponential phase. These genes also presented significant downregulation ($p < 0.05$) in the 21/1 ratio between cultivation phases. The third group, *ELO6* b1, only presented significant downregulation ($p < 0.05$) in the 7/1 treatment between cultivation phases.

4.4 Discussion

In the present study, 1.5 and 3 fold higher phosphorus concentration in culture media did not lead to a difference in cell density or biomass concentrations, in comparison to the control treatment (21/1). In a similar approach, Yongmanitchai and Ward [10] did not find

any significant difference in biomass concentration by increasing the orthophosphate levels 2.5 and 5 fold higher than the control treatment.

These results might be explained because of the importance of phosphorus in oceans, which can be a limiting factor for microalgae growth. In this type of environment, cells tend to assimilate more phosphorus than the necessary for growth, storing the excess in vacuoles and/or in the chloroplast. This behavior is often called “luxurious uptake” and usually does not bring to an increase in culture biomass [25].

The fatty acid profile of *P. tricorutum*, regardless of the N/P ratio, was comprised mainly by Myristic, Palmitic, Palmitoleic, Hexadecatrienoic and Eicosapentaenoic acids (approximately 80% of total fatty acids), which is similar to what is found in the literature, with some minor fluctuations in class proportion [11]. Also, it could not be observed any significant difference between these fatty acids and N/P ratios. In Yongmanitchai and Ward [10], three N/P treatments of approximately 20/1, 8/1 and 4/1 in the exponential phase produced similar amounts of Palmitic, Palmitoleic, Oleic and Eicosapentaenoic acids across all treatments.

Concerning the changes in SFA, MUFA and PUFA classes between phases, an increase in saturated and monounsaturated fatty acids (51.72% to 64.86%) was noted as expected because these fatty acid classes are more related to higher triacylglycerides (TAG) synthesis in the stationary phase; TAGs serve as an energy storage molecule in microalgae [26].

For the PUFAs, more precisely EPA, the decrease in concentration from the exponential to stationary phases (28.64% to 21.89%) might be explained by the structural function of this fatty acid, notably related to membrane stability and fluidity in photosynthesis, which is more intense in the exponential phase. Also, this phenotype (high EPA concentration) in *P. tricorutum*, and in other temperate diatoms rich in long chain PUFAs can be explained by the cold environment they inhabit, reducing the fluidity of their membrane systems [27].

The EPA importance in the thylakoid membrane structure and photosynthesis dynamics might be corroborated by the high proportion of this fatty acid found in glycerolipid strongly associated to photosynthesis and chloroplast membranes. In *P. tricorutum*, according to Abida, Dolch [28], EPA is the major fatty acid in monogalactosyl-diglycerides (MGDG) and phosphatidil-choline (PC) – almost 40% and 35% of total associated fatty acids, respectively – two of the most

abundant glycerolipids alongside with sulfoquinovosyl-diacylglycerides (SQDG), which are responsible for maintaining membrane fluidity throughout the chloroplast membranes during photosynthesis.

Additionally, the high proportion of EPA in PC might explain the importance of phosphorus in *P. tricornutum* EPA levels, reaching 26.8% of total fatty acids in phosphorus replete medium against 6.9% in phosphorus depleted medium [14]. Indeed, Abida, Dolch [28] found that PC levels were not detected in *P. tricornutum* cultivation with phosphorus starvation for 10 days. However, EPA levels were similar between starved and control cultures. Again, this shows the importance of this fatty acid upkeep for structural functions in chloroplast membranes.

Regarding the gene transcript level analysis, the group of genes that were upregulated in the stationary phase – *PTD15*, *ELO6 b2* and *PTD5 beta* – are not exclusively committed to EPA biosynthesis whereas EPA levels decreased during this phase. Therefore, their protein products might be involved in other fatty acids biosynthesis steps such as Myristic acid biosynthesis, in the case of the elongases, or other PUFAs, like Hexatetraenoic acid (C16:4) for the other two desaturases. In fact, *PTD5 beta* could be associated with the synthesis of linoleic acid from oleic acid in some microalgae. According to Domergue, Lerchl [17], these desaturations and elongations are rather nonspecific, indicating that these enzymes are committed to several other fatty acid syntheses.

The relationship between gene transcription level profiles and EPA concentration among the different treatments, if any, is complex. Whereas two genes, the front-end desaturases *PTD6* and *PTD5 alpha*, were modulated by at least one N/P ratio, the EPA levels were unaffected by these conditions. Still, at least in one N/P ratio (21/1), the upregulation of *PTD5 alpha* in the exponential phase relative to the stationary phase matches the decrease in EPA concentration between the same two phases.

Furthermore, even with the upregulation of some genes in the stationary phase, the intermediary fatty acids such as stearidonic and eicosatetraenoic acid were not present in *P. tricornutum* biomass. Therefore, a post-transcriptional control may tightly regulate the EPA biosynthesis pathway because of its importance in photosynthesis and microalgae growth [29].

Previously, several studies identified desaturases from diverse microalgae taxa, although only a handful of studies attempted to

correlate the expression of PUFA biosynthesis genes with environmental changes in these microorganisms.

One study correlated the transcript levels of three front-end desaturases involved in Arachidonic acid (ARA) biosynthesis with the phenotype (ARA levels) during growth in a nitrogen starvation condition, in the green algae *Parietochloris incisa*. The authors found that the gene expression levels followed the pattern of ARA accumulation in biomass during cultivation [30].

Huerlimann, Steinig [29], studied the effect of nitrate starvation as well as the growth phase on gene expression of four front-end desaturases related to DHA biosynthesis in *Isochrysis galbana* (TISO). Similar to this study, DHA levels remained constant independent of the growth phase or nitrogen starvation and normal cultivation conditions, even with relative upregulation of three desaturases in the exponential cultivation phase.

Because of *P. tricornutum* high EPA levels in biomass, several studies concentrated on taking advantage of this feature to enhance EPA production or even other PUFAs of commercial interest. Peng, Zheng [31] cloned and overexpressed *PTD5* beta in *P. tricornutum*, improving EPA concentration 1.8 fold (3 to 5.5% of dry weight) in comparison to the wild type strain. In another study, Hamilton, Haslam [32] engineered *P. tricornutum* with transgenes from the microalgae *Ostreococcus tauri*, producing a transgenic strain, which accumulates high levels of DHA and reaches concentrations 8 times higher than the wild type strain.

In conclusion, no significant differences were found in the biomass, cell density or major fatty acids proportions in *P. tricornutum* during all cultivation phases between the N/P ratios evaluated. However, the shift from the exponential to the stationary phase in cultivation lead to an increase of SFA and MUFA proportion of total fatty acids and a decrease in PUFA, notably EPA, as expected.

All gene transcript levels evaluated were modulated by the growth phase, however only the two final front-end desaturases, *PTD6* and *PTD5* alpha, were also upregulated in the 21/1 treatment in relation to the other two N/P ratios.

4.5 Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian Ministry of Science, Technology, Innovation and Communication (MCTIC) for financial support provided by FINEP (Agreement No. 01.10.0457.00) and CNPq (Case No. 407513/2013-2).

4.6 Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

4.7 References

- [1] Hulbert AJ, Abbott SK. Nutritional ecology of essential fatty acids: an evolutionary perspective. *Aust J Zool* 2011;59(6):369.
- [2] Simopoulos AP. Omega-3-Fatty-Acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991;54(3):438-63.
- [3] Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P. The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutr* 2007;7(1a).
- [4] Karr JE, Alexander JE, Winningham RG. omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition throughout the lifespan: A review. *Nutr Neurosci* 2011;14(5):216-25.
- [5] Ruxton CH, Reed SC, Simpson MJ, Millington KJ. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 2004;17(5):449-59.
- [6] Luchtman DW, Song C. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: Findings from animal and clinical studies. *Neuropharmacol* 2013;64:550-65.
- [7] Nichols PD, Petrie J, Singh S. Long-chain omega-3 oils – an update on sustainable sources. *Nutrients* 2010;2(6):572-85.
- [8] Khozin-Goldberg I, Iskandarov U, Cohen Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *App Microbiol Biotechnol* 2011;91(4):905-15.
- [9] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 2006;101(2):87-96.
- [10] Yongmanitchai W, Ward OP. Growth of and Omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricorutum* under different culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 1991;57(2):419-25.
- [11] Cartens M, Grima EM, Medina AR, Gimenez AC, et al. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *J Am Oil Chem Soc* 1996;73(8):1025-31.
- [12] Ceron Garcia MC, Camacho FG, Miron AS, Sevilla JMF, et al. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* on various carbon sources. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16(5):689-94.

- [13] Miron AS, Gomez AC, Camacho FG, Grima EM, et al. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *J Biotechnol* 1999;70(1-3):249-70.
- [14] Siron R, Giusti G, Berland B. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricoratum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar Ecol Prog Ser* 1989;55(1):95-100.
- [15] Yang ZK, Niu YF, Ma YH, Xue J, et al. Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnol Biofuels* 2013;6.
- [16] Arao T, Yamada M. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom, *Phaeodactylum tricoratum*. *Phytochemistry* 1994;35(5):1177-81.
- [17] Domergue F, Lerchl J, Zahringer U, Heinz E. Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricoratum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur J Biochem* 2002;269(16):4105-13.
- [18] Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 2008;456(7219):239-44.
- [19] Guillard RR, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms .1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran *Can J Microbiol* 1962;8(2):229-&.
- [20] Furman NH, Welcher FJ. Standard methods of chemical analysis 6th ed. Huntington, N.Y.: R. E. Krieger Pub. Co.; 1975.
- [21] Kerouel R, Aminot A. An optimized procedure for analyzing nutrients dissolved in sea water which minimizes contamination. *Mar Environ Res* 1987;22(1):19-32.
- [22] Siaux M, Heijde M, Mangogna M, Montsant A, et al. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricoratum*. *Gene* 2007;406(1-2):23-35.
- [23] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
- [24] Menezes RS, Leles MIG, Soares AT, Franco PIBEM, et al. Evaluation of the potentiality of freshwater microalgae as a source of raw material for biodiesel production. *Quim Nova* 2013;36(1):10-5.
- [25] Reynolds CS. Ecology of phytoplankton. Cambridge: Cambridge University Press; 2006. 13, 535 p.

- [26] Huerlimann R, de Nys R, Heimann K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol Bioeng* 2010;107(2):245-57.
- [27] Valentine RC, Valentine DL. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog Lipid Res* 2004;43(5):383-402.
- [28] Abida H, Dolch L-J, Meř C, Villanova V, et al. Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol* 2015;167(1):118-36.
- [29] Huerlimann R, Steinig EJ, Loxton H, Zenger KR, et al. Effects of growth phase and nitrogen starvation on expression of fatty acid desaturases and fatty acid composition of *Isochrysis* aff. *galbana* (TISO). *Gene* 2014;545(1):36-44.
- [30] Iskandarov U, Khozin-Goldberg I, Cohen Z. Identification and characterization of delta 12, delta 6, and delta 5 desaturases from the green microalga *Parietochloris incisa*. *Lipids* 2010;45(6):519-30.
- [31] Peng KT, Zheng CN, Xue J, Chen XY, et al. Delta 5 fatty acid desaturase upregulates the synthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J Agr Food Chem* 2014;62(35):8773-6.
- [32] Hamilton ML, Haslam RP, Napier JA, Sayanova O. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricorutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metab Eng* 2014;22:3-9.

Table 1. List of primers used, gene names, primer names, sequences, amplicon size, and NCBI Reference Sequence (NCBI GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Gene Name	Primer Name	Sequences	Amplicon size (nt)	NCBI Reference Sequence
<i>PTD15</i> ($\Delta 15$ -Desaturase)	PTD15f	5'-TCGAAGAAGCGACGAAAATCC-3'	102	XM_002185462.1
	PTD15r	5'-TGGCAATCTCCTGCGTAAAG-3'		
<i>PTD6</i> ($\Delta 6$ -Desaturase)	PTD6f	5'-ACTACGCTTGGATGCTTACC-3'	114	XM_002182865.1
	PTD6r	5'-AGACAATGGCGAGCAAGAA-3'		
<i>ELO6_b1</i> (Elongase $\Delta 6$ b1)	ELO6_b1f	5'-GCTATCATGGTCTTGCATAAAGG-3'	120	XM_002182520.1
	ELO6_b1r	5'-GAGGTACGAGCTGACAAAGAA-3'		
<i>ELO6_b2</i> (Elongase $\Delta 6$ b2)	ELO6_b2f	5'-CACACCACCATCTTTCTCTCT-3'	105	XM_002180392.1
	ELO6_b2r	5'-GTACATGACGGTGTGGATGAA-3'		
<i>PTD5α</i> ($\Delta 5$ -Desaturase alfa)	PTD5af	5'-CCGAACCAATGCTCCTATTCA-3'	119	XM_002185696.1
	PTD5ar	5'-GACAGCGGACAACCAAGTATC-3'		
<i>PTD5β</i> ($\Delta 5$ -Desaturase beta)	PTD5bf	5'-TCGGCCTGGTATCCCTTTAT-3'	131	XM_002182822.1
	PTD5br	5'-CCACCAGTCACGTGCAAATA-3'		
<i>RPS</i> (Ribosomal protein small subunit 30s)	RPSf	5'-CCGGTCTCTTGACATTAGT-3'	110	XM_002178225.1
	RPSr	5'-GACCTGTGTCGGTTCGATAAT-3'		
<i>H4</i> (Histone H4)	H4f	5'-ATTCGTGATTCGGTACCTATAC-3'	108	XM_002179469.1
	H4r	5'-TCCGAATCCGTAGAGAGTCTT-3'		

Table 2. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles in percentage of total Fatty Acids (FA) of *P. tricornutum* biomass in different N/P ratios and cultivation phases.

Retention time (min)	FAME Name	% of total FA					
		Exponential Phase			Stationary Phase		
		21/1	14/1	7/1	21/1	14/1	7/1
15	Myristic (M, C14:0)	7.56 ± 0.05	7.83 ± 0.18	7.49 ± 0.62	5.43 ± 1.26	6.62 ± 0.66	6.68 ± 0.19
17.2	Palmitic (P, C16:0)	16.06 ± 0.04	13.40 ± 0.8	15.17 ± 0.95	21.87 ± 1.09	23.71 ± 6.30	18.91 ± 1.63
17.5	Palmitoleic (Po, C16:1 Δ9)	26.3 ± 1.13	24.65 ± 1.85	25.62 ± 1.66	29.24 ± 5.43	27.99 ± 7.18	33.07 ± 2.37
17.8	11-Hexadecaenoic (C16:1 Δ11)	0.81 ± 0.05	0.73 ± 0.06	0.64 ± 0.01	0.20 ± 0.12	0.43 ± 0.30	0.27 ± 0.1
17.9	7.10-Hexadecadienoic (C16:2 Δ7,10)	1.26 ± 0.11	1.48 ± 0.21	1.32 ± 0.42	0.26 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.27 ± 0.03
18.2	9.12-Hexadecadienoic (C16:2 Δ9,12)	1.91 ± 0.15	2.04 ± 0.42	1.97 ± 0.5	0.46 ± 0.07	0.51 ± 0.15	0.66 ± 0.04
18.6	7.10.12-Hexadecatrienoic (C16:3 Δ7,10,12)	9.51 ± 1.48	11.90 ± 1.85	9.81 ± 1.60	3.82 ± 0.84	3.88 ± 1.74	4.08 ± 0.16
18.8	3.6.9.12-Hexadecatetraenoic (C16:4 Δ3,6,9,12)	0.75 ± 0.22	0.86 ± 0.23	0.87 ± 0.35	1.41 ± 0.28	1.66 ± 0.91	0.58 ± 0.41
19.3	6.9.12.15-Hexadecatetraenoic (C16:4 Δ6,9,12,15)	0.91 ± 0.31	1.04 ± 0.35	0.81 ± 0.18	1.13 ± 0.25	1.26 ± 0.50	2.04 ± 0.30
19.6	Stearic (C18:0)	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.54 ± 0.69	0.47 ± 0.34	0.14 ± 0.14
19.9	Oleic (C18:1 Δ9)	2.86 ± 0.80	3.00 ± 0.94	2.89 ± 0.82	8.65 ± 3.94	6.30 ± 1.82	4.12 ± 0.48
20.6	Linoleic (C18:2 Δ9,12)	2.29 ± 0.55	2.41 ± 0.67	2.23 ± 0.73	4.46 ± 4.20	3.60 ± 1.97	2.49 ± 0.5
21.1	Gamma Linolenic (C18:3 Δ6,9,12)	0.62 ± 0.22	0.87 ± 0.32	0.29 ± 0.06	0.54 ± 0.16	0.52 ± 0.33	0.80 ± 0.32
21.6	Linolenic (C18:3 Δ9,12,15)	0.52 ± 0.05	0.43 ± 0.08	0.34	0.67 ± 0.5	2.10 ± 3.3	0.34 ± 0.04
22.1	Arachidonic (C20:4 Δ5,8,11,14)	0.79 ± 0.04	0.78 ± 0.05	0.70 ± 0.09	0.56 ± 0.19	0.57 ± 0.06	0.63 ± 0.16
27.2	Eicosapentaenoic (C20:5 Δ5,8,11,14,17)	27.72 ± 0.95	28.49 ± 1.08	29.72 ± 1.32	20.76 ± 3.93	20.07 ± 5.77	24.94 ± 0.83
	Total	100.00	100.00	100.00	100.0	100.00	100.00
	SFA Σ	23.75	21.32	22.79	27.84	30.79	25.87
	MUFA Σ	29.97	28.38	29.15	38.09	35.05	37.46
	PUFA Σ	29.65	30.57	31.05	22.53	23.26	26.71

Each value corresponds to the average ± SD, n=4.

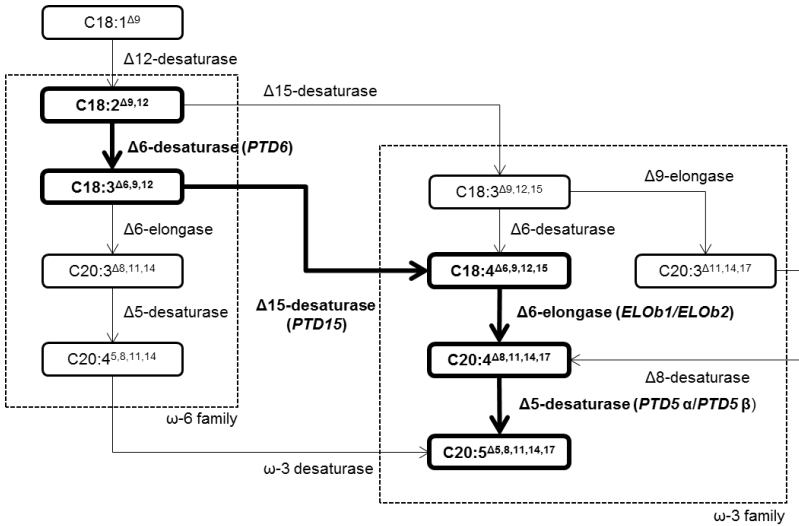


Figure 1. EPA biosynthesis possible pathways, according to Arao and Yamada (1994). Bold lines and boxes indicate the most active route involving ω-6 and ω-3 fatty acids families. ω-9 fatty acids: Oleic acid (C18:1^{Δ9}). ω-6 fatty acids: Linoleic acid (C18:2^{Δ9,12}); γ-Linolenic acid (C18:3^{Δ6,9,12}); Di-homo-γ-linolenic acid (C20:3^{Δ8,11,14}); Arachidonic acid (C20:4^{Δ5,8,11,14}). ω-3 fatty acids: α-Linolenic acid (C18:3^{Δ9,12,15}); Stearidonic acid (C18:4^{Δ6,9,12,15}); Eicosatrienoic acid (C20:3^{Δ11,14,17}); Eicosatetraenoic acid (C20:4^{Δ8,11,14,17}); Eicosapentaenoic acid (C20:5^{Δ5,8,11,14,17}).

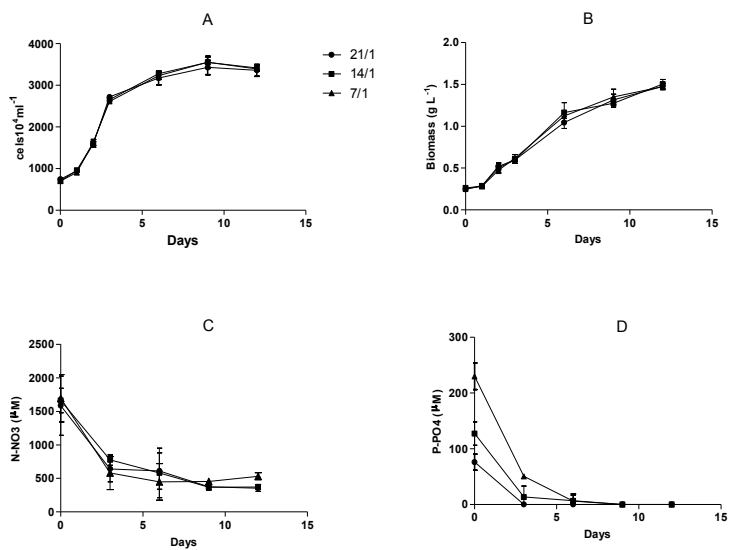


Figure 2. Cellular Density (A), Biomass (B), Nitrate concentration (C) and Orthophosphate concentration (D) during 12 cultivation days of *P. tricornutum*. Each data point indicates the average \pm SD. n=4.

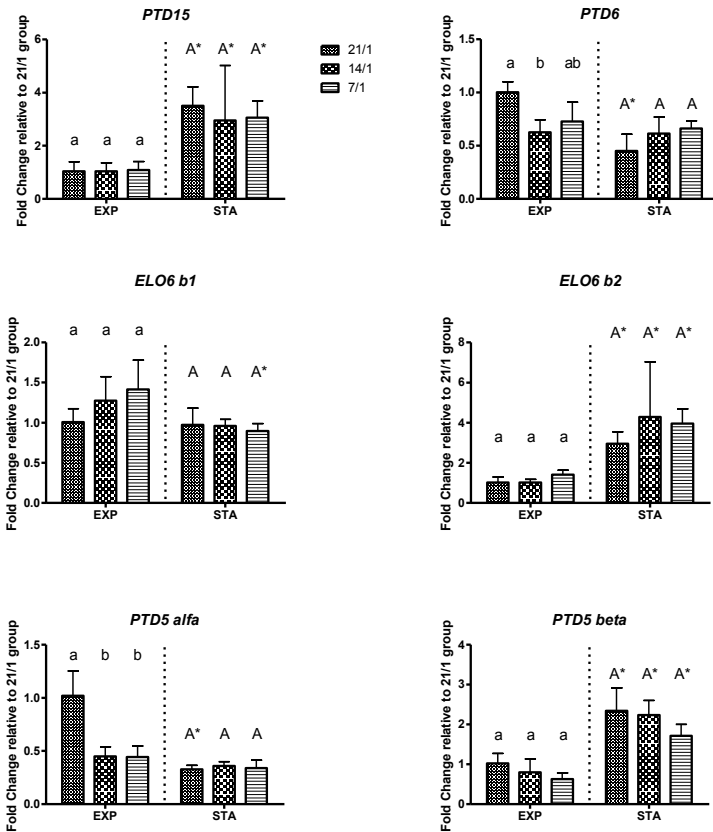


Figure 3. Relative gene expression of *PTD15*, *PTD6*, *ELO6 b1*, *ELO6 b2*, *PTD5 alpha* and *PTD5 beta* using *RPS* and *H4* as reference genes, in 21/1, 14/1 and 7/1 N/P ratios in the exponential (EXP) and stationary (STA) cultivation phases. Bars indicate mean \pm SD. n=4. Letters indicate significant differences in the same phase with different N/P ratios (Kruskal-Wallis test, Dunn's post hoc test, $P < 0.05$). * indicates significant differences in the same N/P ratio in different cultivation phases (Mann-Whitney test, $P < 0.05$).

5 Artigo 2

Formatado de acordo com o Journal of Phycology. A ser submetido.
(ISSN: 1529-8817 IF: 2,536, Qualis B1, Área Biotecnologia).

The effect of different photoperiods on the transcript levels of the Eicosapentaenoic acid biosynthesis genes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Rafael Garcia Lopes*^{1, 2}, Herculano Cella¹, Jacó Joaquim Mattos³, Maria Risoleta Freire Marques³, Roberto Bianchini Derner¹, Leonardo Rubi Rörig².

¹ Laboratory of Algae Cultivation, Department of Aquaculture, Center of Agrarian Sciences. Federal University of Santa Catarina.

² Laboratory of Phycology, Department of Botany, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina.

³ Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry, Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina.

*Corresponding author. E-mail: rafael.lobes@ufsc.br. Phone number: +55 048 3721-4106/ +55 048 98404-9519.

5.1 Introduction

Marine diatoms from temperate environments naturally contain high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA), notably Eicosapentaenoic (EPA) and Docosahexaenoic acids (DHA) (Khozin-Goldberg et al. 2011). This feature makes these microalgae very relevant in the marine environment, serving as feed for animals at higher trophic levels, which cannot synthesize these molecules *de novo* (Borowitzka 1997; Harwood and Guschina 2009).

This microalgae phenotype (PUFA accumulation) has the potential to supply the growing consumer's market since the natural feedstock, comprising mainly fish, mollusks and crustaceans have been compromised, mostly because of their environments contamination and sustainability (Nichols et al. 2010).

One diatom, *Phaeodactylum tricornutum* has been investigated in physiological and biochemical studies over several decades because it naturally accumulates up to 40% EPA (ω -3 PUFA, C20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}) of the total fatty acid content (Yongmanitchai and Ward 1991), reaching 1 to 2% of the ash-free dry biomass (Ceron Garcia et al. 2006).

In *P. tricornutum*, EPA is one of the major components of the total fatty acid content, together with Palmitic (C16:0) and Palmitoleic (C16:1 ^{Δ 9}) acids, with a fluctuation in proportion depending on some cultivation parameters, such as the cultivation phases (Yang et al. 2014). For example, in the stationary phase the proportion of both Palmitic and Palmitoleic acids tend to increase while the EPA levels decrease, mainly because of TAG (triacylglycerol) biosynthesis, which is comprised mainly by saturated and monounsaturated fatty acids. In fact, the most common TAG form in *P. tricornutum* is 16:1/16:1/16:0 (Mühlroth et al. 2013; Abida et al. 2015).

In addition to the energy reserve metabolism, these fatty acids have an important structural function in the photochemical part of photosynthesis, especially EPA, covering up to 35% of the total thylakoid membrane glycerolipids. For instance, EPA is the major fatty acid in monogalactosyl-diacylglycerides (MGDG) and phosphatidylcholine (PC) – almost 40% and 35% of total associated fatty acids, respectively – two of the most abundant glycerolipids alongside with sulfoquinovosyl-diacylglycerides (SQDG), which are responsible for maintaining membrane fluidity throughout the chloroplast membranes (Abida et al. 2015; Dolch and Maréchal 2015).

The EPA biosynthesis pathway, as described by Arao and Yamada (1994) using gas chromatography and radioisotope labeling

chase experiments, has four possible routes starting from Oleic acid (OA, C18:1^{Δ9}, ω-9), and the most active EPA biosynthesis pathway involves four desaturation steps and one elongation step. This route involves fatty acids from the ω-6 family – Linoleic acid (LA, C18:2^{Δ9,12}) and Gamma-Linolenic acid (GLA, C18:3^{Δ6,9,12}) – and the ω-3 family Stearidonic acid (SDA, C18:4^{Δ6,9,12,15}), Eicosatetraenoic acid (ETA, C20:4^{Δ8,11,14,17}) and EPA.

These reactions are located in the Endoplasmic Reticulum (ER), and they are catalyzed by two membrane bound front-end desaturases, Δ6 and Δ5, which convert LA to GLA and ETA to EPA, respectively. Another desaturase (Δ9) converts OA to LA, in addition to a Δ15 desaturase that makes the conversion between the two PUFA families: GLA to SDA. Lastly, this pathway is composed by an elongase that transforms SDA to ETA (Mühlroth et al. 2013).

In *P. tricornutum*, there are five desaturases genes characterized, *FAD2*, *FAD6*, *PTD5* (alpha and beta) and *PTD6*, with the last two encoding for Δ5 and Δ6 desaturases, respectively. However, it was identified eight putative sequences in the diatom genome, some of which could be associated to the EPA biosynthesis pathway based on prediction of substrate specificity and localization (Domergue et al. 2002; Dolch and Maréchal 2015).

Since EPA is more related to a structural function in photosynthesis, light and more precisely photoperiod (light regimes) could be affecting fatty acid biosynthesis related to chloroplast membrane functions. Moreover, the photoperiod could be interacting with the EPA biosynthetic pathway in a molecular level, e.g., modulating gene transcripts levels.

However, little information is available in how the light regimes are influencing key gene transcription on this pathway, like the desaturases. For instance, Chauton et al. (2013) reported the transcription profiles of the carbon fixation, storage and utilization in *P. tricornutum* cultures acclimated to a 16:8 photoperiod. Some front-end desaturases involved in EPA biosynthesis, more precisely *PTD6* (Δ6-desaturase) and *PTD5* beta (Δ5-desaturase) were shown to have similar expression patterns, reaching peak expression levels after the onset of the light period.

Therefore, in the present work, we analyzed how three different photoperiods influence growth, pigment content and the transcription profiles of EPA biosynthesis pathway genes in the microalgae *P. tricornutum*.

5.2 Material and methods

5.2.1 Culture conditions and experimental design

The diatom *Phaeodactylum tricornutum* strain CCAP1055/1 was maintained in *f/2* medium (Guillard and Ryther 1962) plus 80 mg L⁻¹ sodium silicate in 100 mL flasks inside a germination chamber with an 8:16 photoperiod at 20°C. The culture was diluted once a week for maintenance purposes.

The assay was carried out in 1 L borosilicate flasks with a 0.8 L working volume, in the same culture medium and at 22 ± 1°C under three different photoperiods: 12:12, 16:8 and 24:0 in irradiance of 200 μmol m⁻² s⁻¹ with four replicas for each treatment. The cultures were agitated with pressurized atmospheric air supplemented with 0.5% CO₂ (v/v).

Before the experiment, all treatments were acclimated in all photoperiods during 7 days, with a daily culture dilution (*f/2* plus silicate) to avoid self-shading. After acclimation, the assay was carried out for 26 hours, with 7 sampling points (T0, T6, T10, T14, T18, T22, T26) for growth evaluation, pigment content determination, and qPCR analysis.

5.2.2 Growth evaluation

Biomass was estimated indirectly by absorbance readings at 700 nm with a UV-Vis spectrophotometer (Thermo), according to the equation: Biomass (g L⁻¹) = ABS700*0.0025, R² = 0.99631.

5.2.3 Pigment Analysis

For all sampling points, 10 mL of each experimental unit was filtered through a 0.45 μm glass fiber filter, and stored at -20°C until analysis. Then, the pigments were extracted according to Strickland and Parsons (1972). The pigment content was calculated indirectly according to Jeffrey and Humphrey (1975) for the photosynthetic pigments (Chlorophyll *a* and *c*) and according to Carreto and Catoggio (1977) for diatom carotenoid content (Fucoxanthin, Diadinoxanthin and β-carotene) through absorbance reads at 480, 510, 664 and 630 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Thermo). All pigment concentrations were given as mg g⁻¹ dry biomass, and all data points were presented as the mean (n=4) ± SD.

5.2.4 RNA purification and cDNA synthesis

Culture samples were taken according to Siaut et al. (2007) from each experimental unit. The culture was centrifuged (2000 x g, 5 minutes), washed 1x with sterile marine water, with the pellet immediately frozen in liquid nitrogen, and later then stored at -80°C. Total RNA was purified from 10⁸ cells using 1 mL of Qiazol Lysis Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Concentration was estimated at 260 nm, with purity being checked in 260/280 (>1.8) and 260/230 ratios, on a Nanodrop 1000 (Thermo).

Then, cDNA was synthesized with the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Prior to reverse transcription, 1 µg of total RNA was treated with the provided gDNA wipeout buffer for 2 min at 42°C to eliminate gDNA contamination. The cDNA concentration and purity was then checked on a Nanodrop as previously described.

5.2.5 qPCR conditions/analysis

The EPA biosynthesis pathway considered was the most active route according to Arao and Yamada (1994). Primers were designed using the OligoAnalyzer software (IDT, <http://www.idtdna.com>) based on sequences of mRNAs from the DiatomCyc database (<http://www.diatomcyc.org>), and the resulting primer pairs are listed in Table 1. *PTD15*, *ELO6b1* and *ELO6b2* were putative sequences annotated, and *PTD6*, *PTD5* alpha and *PTD5* beta were previously described by Domergue et al. (2002).

In all experimental units, qPCR reactions were performed using 100 ng template cDNA in a total reaction volume of 20 µL in duplicate. The samples were amplified using the QuantiFast® SYBR® Green PCR kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions using the Real-Time Cycler Rotor Gene Q® (Qiagen) and Rotor Gene 6000 Series software (Qiagen). The cycling conditions were as follows: PCR initial heat activation (95 °C for 5 min); denaturation (95 °C for 10 s); and combined annealing/ extension (60 °C for 30 s) repeated for 35 cycles. After the amplification phase, the amplicons were subjected to a melt curve analysis (ramp from 72 °C to 95 °C. with 1 °C increase/step) to ensure that non-specific annealing was not occurring. In every run, duplicate negative reverse transcription controls (no gDNA buffer

wipeout treatment) and blank controls (molecular biology grade water) were included. All controls did not display amplification after 35 cycles.

In each run, qPCR efficiency (E) was checked for each primer pair by constructing a standard curve from serial dilutions (1:1) with 300, 150, 75, 37.5 and 18.75 ng (in duplicates) from a pool of all cDNA samples. Only curves with efficiencies ranging from 95% and 100% were used, and the Rotor Gene 6000 Series software automatically calculated the E after threshold setting.

5.2.6 Relative gene transcription/expression levels

For gene transcription level normalization, *RPS* (small ribosomal subunit 30S), *H4* (Histone) and *TBP* (TATA box binding protein) genes were used as reference (Table 1), according to Siaux et al. (2007). For more robust relative expression analysis, the geometric mean of the three references genes (Ref GM) was chosen after analysis using the geNORM software. The mean T0 (n=4) for each photoperiod was used as the calibration condition (second normalization). Relative gene transcription levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (Livak and Schmittgen 2001) in which the first normalization,

$$\Delta Cq_{\text{(sample)}} = Cq_{\text{(sample)}} - Cq_{\text{(Ref GM)}}$$

And the second normalization,

$$\Delta\Delta Cq_{\text{(sample)}} = \Delta Cq_{\text{(sample)}} - \Delta Cq_{\text{(T0)}}$$

All relative expression values were presented as the fold change number relative to the transcript levels of T0 of each photoperiod, and all data was normalized to a \log_2 ratio.

5.3 Results

5.3.1 Acclimation and growth evaluation of *P. tricornutum* under 3 different photoperiods

All experimental units were previously acclimated for a period of 7 days prior to the 26-hour growth evaluation (Figure 1A). All cultures were diluted daily to minimize any self-shading effects. Average irradiance measurements were made in all experimental units during 7 days to check for irradiance differences among the distinct photoperiods.

This procedure was repeated before and after the daily dilutions for each treatment in 3 different cultivation flask positions (Figure 1B).

During the 26-hour growth evaluation, the treatments 16:8 and 24:0 behaved similarly growing throughout the light-dark cycle, in contrast to the cultures under the 12:12 photoperiod, with no apparent biomass increase during the dark part of the cycle.

The average irradiance values prior and after the daily dilution were similar between the 12:12 and 16:8 photoperiods in all 3 positions, ranging from 100 to 118 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at P1, 45 to 66 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at P2, and 29 to 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at P3. However, in the cultures submitted to continuous illumination the values were, in average, 25% higher in all measuring positions, reaching up to 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at P1 after dilution. In all experimental units, regardless the treatment, the attenuation effect of increasing the distance from the light source was similar (P1 to P3).

5.3.2 Pigment Analysis

All three different photoperiods presented distinct patterns in pigment concentration during the 26-hour growth evaluation (Figure 2). These three pigment profiles associated to three different photoperiods could corroborate that the cultures were indeed acclimated, after seven days.

The cultures under the 12:12 photoperiod showed a chlorophyll *a*, chlorophyll *c* and fucoxanthin concentration increase, being the highest at T10 – 19.8, 3.0, 15.6 mg g^{-1} , respectively, in average – during the illuminated part of the cycle (Figure 2A), with a decrease in these pigment concentrations at the onset of the dark period, and becoming constant until the light period resumed.

The 16:8 treatment pigment concentration evolution (Figure 2B) was similar to the 12:12 light regime, as the exception being the drop of fucoxanthin (14.0 to 8.5 mg g^{-1}), chlorophyll *a* (17.6 to 10.0 mg g^{-1}) and *c* (2.4 to 1.5 mg g^{-1}) from T10 to T14, which was still in the illuminated part of the cycle.

The cultures kept under continuous lighting presented all pigments concentrations, in average, (6.1 mg g^{-1} to fucoxanthin, 7.8 mg g^{-1} to chlorophyll *a* and 1.1 mg g^{-1} to chlorophyll *c*) lower values than the other two treatments, and more constant throughout the 26-hour cycle.

The Diadinoxanthin and β -carotene contents remained constant (inferior to 1.0 mg g^{-1}) throughout the cycle, in all treatments.

5.3.3 EPA biosynthesis pathway gene expression.

All treatments presented different gene transcript profiles (Figure 3). In the 12:12 photoperiod treatment (Figure 3A), the two front-end desaturases *PTD5* alpha and *PTD6* presented similar expression patterns, which consisted in a relative overexpression values from T6 throughout the cultivation period, ranging from 16-fold change for *PTD5* alpha and 8-fold change for *PTD6*. In contrast, *PTD5* beta (homologous to *PTD5* alpha) had a more constant expression profile, with a relative transcription drop at T22. The two elongases, *ELO6* b1 and b2, both had similar transcription behaviors as well, with the latter being down-regulated at T14 (onset of the dark period). The desaturase *PTD15* gene presented a stable two-fold upregulation over the whole cycle, with the exception of T22 (five fold upregulation).

In contrast, the 16:8 treatment (Figure 3B) presented a more coordinated expression profile of most of the EPA biosynthesis genes. Among them, *PTD5* alpha, *PTD6* and *ELO6* b1 showed very similar transcript levels during the 26-hour cultivation, reaching peak transcript levels at the end of the dark period (T22), and at the onset of the light period (T26). Again, the *PTD5* beta had an opposite expression profile when compared to its homologous counterpart (*PTD5* alpha). Regarding the *PTD15* expression profile, it behaved similarly to the 12:12 photoperiod, with a slight downregulation at T22. In contrast, the *ELO6* b2 showed a very distinct expression profile, with a fold change ranging from 4 to -4 during the light period, and remained negative from T4 onwards.

Lastly, the expression profile of the continuous light treatment was very stable, with almost no relative differences in expression levels when compared to T0, with some exceptions, like the *ELO6* b2 (transcript level spike at T6) and the front-end desaturases genes, *PTD5* alpha and *PTD6*, with a 4-fold change at T26.

5.4 Discussion

In microalgae growth, one of the most important cultivation parameters is light, in the form of irradiance, light quality (available spectrum wavelengths) and the photoperiod in which these microalgae cells are exposed to (Masojídek et al. 2013).

When working with this parameter, it is often necessary to control the algae growth, since continuous biomass increase would involve higher culture turbidity, which in turn could implicate in culture self-

shading. Indeed, when Chauton et al. (2013) analyzed the effects of photoperiod on the transcript profiles of the carbon fixation, storage and utilization in *P. tricornutum* over a 24-hour period, the microalgae were kept in a steady-state cultivation (1.4 d^{-1} dilution rate) to ensure homogeneity of light diffusion throughout the growth cycle.

Therefore, all cultures were diluted daily to similar biomass values in all treatments to avoid self-shading interference, and the irradiance was measured daily to corroborate that all treatments were receiving the same irradiance amount and to attest that there was not a large difference between the irradiance levels prior and after the daily dilutions.

After the seven-day acclimation, the cultures in the continuous illumination treatment (24:0) had irradiance values, in average, 25% higher than the other two treatments, with no biomass concentration (prior and after dilution) differences when compared to the 12:12 and 16:8 photoperiods.

This could be explained by the different pigment accumulation profiles between the cultures under continuous illumination and the ones under other two light regimes. The cells exposed to a 24:0 photoperiod presented lower concentrations of photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and *c*) and carotenoids (fucoxanthin, diadinoxanthin and β -carotene). This phenotype is often common in microalgae taxa. For example, the green fresh water microalgae *Ankistrodesmus falcatus*, when exposed to different photoperiods, presented lower chlorophyll *a*, *b* and total carotenoids values in a 24:0 condition in contrast to the other photoperiods (George et al. 2014).

Regarding the quantitative PCR assays, prior to analysis, it was necessary to find reference genes that could be used as internal standards for gene expression since the light was the variable parameter. Siaux et al. (2007) identified 13 putative potential housekeeping genes in the *P. tricornutum* genome and classified them into 4 groups according to the ΔCq during a 12:12 photoperiod over 48 hours. Therefore, to ensure good qPCR results normalization, the genes with the lower ΔCq (2 to 2.5) were used in this work: *RPS*, *TBP* and *H4*.

The relative qPCR results show three distinct expression profiles for each photoperiod employed. For instance, the desaturases *PTD5* alpha, *PTD6* and *PTD15* of the 12:12 treatment were upregulated for the entire growth period. This pattern might be explained by the shorter amount of light availability, which could be stimulating EPA biosynthesis, since EPA concentrations are shown to increase in face of lower irradiances and shorter light photoperiods (Sukenic et al. 1989).

In the 16:8 photoperiod the expression profile is much more stable towards the end of the dark period, when the *PTD5* alpha and *PTD6* along with *ELO6* b2 were upregulated, what could demonstrate a anticipation in EPA production for membrane assembly prior to the onset of the light period (Chauton et al. 2013).

The 24:0 treatment did not present major shifts in relative gene expression profiles, mostly because of the continuous illumination, which makes the supply of EPA to the thylakoid membrane almost constant, due to MGDG turnover (Khozin-Goldberg et al. 2016).

The two front-end membrane-bound desaturases genes *PTD5* alpha and *PTD6* showed a coexpression pattern regardless of the photoperiod, what could suggest a direct influence of the light regime on its transcription levels. In fact, Domergue et al. (2002) characterized these genes as being very responsive and confirmed the involvement of its proteins products in EPA biosynthesis, through a heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*.

However, Chauton et al. (2013) presented a much different expression profile of both genes, at a 16:8 photoperiods, with a stable high upregulation of *PTD6* at the onset of the light period, while *PTD5* presented two peaks of upregulation, one at the onset of the light and another right before the beginning of the dark period. In the same assay, the *ELO6* b2 transcript profile was very similar to this work at the 16:8 photoperiod.

The present work is the first time that an analysis of the influence of different photoperiods on EPA biosynthesis gene transcription profiles is reported in *P. tricornutum*. In fact, the unsaturation of membrane lipids contributes immensely to its conformation, and therefore its fluidity (Khozin-Goldberg et al. 2016). In the chloroplast, these shifts in glycerolipids unsaturation levels are fundamental to the correct functioning of the light harvesting complexes and photosystems (Dörmann 2005).

Moreover, PUFA like EPA might be associated to long distance electron transport in thylakoid membranes, since the high fluidity which highly unsaturated fatty acids confer could increase the encounter of plastoquinone with cytochrome b₆f immersed in the membrane bilayer, thus increasing the energy production rate via photosynthesis (Valentine and Valentine 2004).

In conclusion, the results demonstrate that photoperiods could modulate the transcription levels of the EPA biosynthesis pathway genes, and therefore helping to consolidate the importance of this fatty acid in the membrane systems linked to photosynthesis.

5.6 Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian Ministry of Science, Technology, Innovation and Communications (MCTIC) for financial support provided by FINEP (Agreement No. 01.10.0457.00) and CNPq (Case No. 407513/2013-2).

5.7 References

1. Abida H, Dolch L-J, Meř C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, Rébeillé F, Petroustos D, Jouhet J, Maréchal E (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 167 (1):118-136.
2. Arao T, Yamada M (1994) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 35 (5):1177-1181.
3. Borowitzka MA (1997) Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* 9 (5):393-401.
4. Carreto JI, Catoggio JA (1977) An indirect method for the rapid estimation of carotenoid contents in *Phaeodactylum tricornutum*: Possible application to other marine algae. *Marine Biology* 40:109-116.
5. Ceron Garcia MC, Camacho FG, Miron AS, Sevilla JMF, Chisti Y, Grima EM (2006) Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *J Microbiol Biotechn* 16 (5):689-694.
6. Chauton MS, Winge P, Brembu T, Vadstein O, Bones AM (2013) Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles. *Plant Physiol* 161 (2):1034-1048.
7. Dolch L-J, Maréchal E (2015) Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Drugs* 13 (3):1317-1339.
8. Domergue F, Lerchl J, Zahringer U, Heinz E (2002) Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end

desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur J Biochem* 269 (16):4105-4113.

9. Dörmann P (2005) Membrane Lipids. In: Murphy D (ed) *Plant Lipids. Biology, utilization and manipulation*. Blackwell Publishing, CRC Press, Oxford, pp 123-160.

10. George B, Pancha I, Desai C, Chokshi K, Paliwal C, Ghosh T, Mishra S (2014) Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for biofuel production. *Bioresource Technol* 171:367-374.

11. Guillard RR, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8 (2): 229-236.

12. Harwood JL, Guschina IA (2009) The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91 (6):679-684.

13. Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equation for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural populations. *Biochimie and Physiology Pflanze* 167:191-194.

14. Khozin-Goldberg I, Iskandarov U, Cohen Z (2011) LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (4):905-915.

15. Khozin-Goldberg I, Leu S, Boussiba S (2016) Microalgae as a source for VLC-PUFA production. In: Nakamura Y, Li-Beisson Y (eds) *lipids in plant and algae Development. Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Switzerland, pp 471-510.

16. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25 (4):402-408.

17. Masojídek J, Torzillo G, Koblížek M (2013) Photosynthesis in microalgae. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology*. 2 edn. Wiley Blackwell, Oxford, pp 21-36.

18. Mühlroth A, Li K, Røkke G, Winge P, Olsen Y, Hohmann-Marriott M, Vadstein O, Bones A (2013) Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of chromista. *Mar Drugs* 11 (11):4662-4697.
19. Nichols PD, Petrie J, Singh S (2010) Long chain Omega-3 oils—An update on sustainable sources. *Nutrients* 2 (6):572-585.
20. Siaux M, Heijde M, Mangogna M, Montsant A, Coesel S, Allen A, Manfredonia A, Falciatore A, Bowler C (2007) Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene* 406 (1-2):23-35.
21. Strickland JD, Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis. Pigments analysis. Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. *Fish Resource Building Canada Bulletin* 167:185-199.
22. Sukenik A, Carmeli Y, Berner T (1989) Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J Phycol* 25:686-692.
23. Valentine RC, Valentine DL (2004) Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Progress in Lipid Research* 43 (5):383-402.
24. Yang Z-K, Zheng J-W, Niu Y-F, Yang W-D, Liu J-S, Li H-Y (2014) Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress. *Environmental microbiology* 16 (6):1793-1807.
25. Yongmanitchai W, Ward OP (1991) Growth of and Omega-3-Fatty acid Production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl Environ Microb* 57 (2):419-425.

Table 1. List of primers used, gene names, primer names, sequences, amplicon size, and NCBI Reference Sequence (NCBI GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Gene Name	Primer Name	Sequences	Amplicon size (nt)	NCBI Reference Sequence
<i>PTD15</i> ($\Delta 15$ -Desaturase)	PTD15f	5'-TCGAAGAAGCGACGAAATCC-3'	102	XM_002185462.1
	PTD15r	5'-TGGCAATCTCCTGCGTAAAG-3'		
<i>PTD6</i> ($\Delta 6$ -Desaturase)	PTD6f	5'-ACTACGCTTGGATGCTTACC-3'	114	XM_002182865.1
	PTD6r	5'-AGACAATGGCGAGCAAGAA-3'		
<i>ELO6_b1</i> (Elongase $\Delta 6$ b1)	ELO6_b1f	5'-GCTATCATGGTCTTGCATAAAGG-3'	120	XM_002182520.1
	ELO6_b1r	5'-GAGGTACGAGCTGACAAAGAA-3'		
<i>ELO6_b2</i> (Elongase $\Delta 6$ b2)	ELO6_b2f	5'-CACACCACCATCTTCTCTTCT-3'	105	XM_002180392.1
	ELO6_b2r	5'-GTACATGACGGGTGGATGAA-3'		
<i>PTD5α</i> ($\Delta 5$ -Desaturase alfa)	PTD5af	5'-CCGAACCAATGCTCCTATTCA-3'	119	XM_002185696.1
	PTD5ar	5'-GACAGCGGACAACCAAGTATC-3'		
<i>PTD5β</i> ($\Delta 5$ -Desaturase beta)	PTD5bf	5'-TCGGCCTGGTATCCCTTTAT-3'	131	XM_002182822.1
	PTD5br	5'-CCACCAGTCAAGTGCAAATA-3'		
<i>RPS</i> (Ribosomal protein small subunit 30s)	RPSf	5'-CCGGTCTCTTGACATTAGT-3'	110	XM_002178225.1
	RPSr	5'-GACCTTGTCGTGGTCGATAAT-3'		
<i>H4</i> (Histone H4)	H4f	5'-ATTCGTGATTCCGTACCTATAC-3'	108	XM_002179469.1
	H4r	5'-TCCGAATCCGTAGAGAGTCTT-3'		
<i>TBP</i> (TATA-box binding protein)	TBPf	5'-TACTGGTGCCAAGAAGGAAATG-3'	100	XM_002186285.1
	TBPr	5'-CCCAGGTACCGTAGTTATATGT-3'		

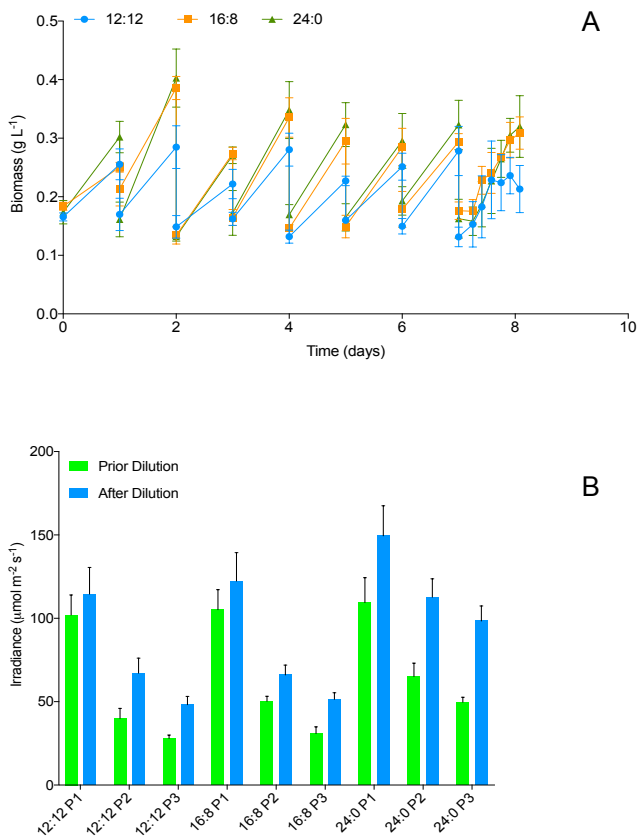


Figure 1. (A) Acclimation and growth curve in biomass of *P. tricornutum*. All data is presented as the mean (n=4) ± SD. (B) The effect of the biomass dilution on the irradiance in 3 positions inside of each experimental unit. P1. Glass-air interface (closest from light source). P2. Middle of the flask. P3. Glass-air interface (farthest from light source). The bars represents the average value (n=4) during the acclimation period (seven days) ± SD.

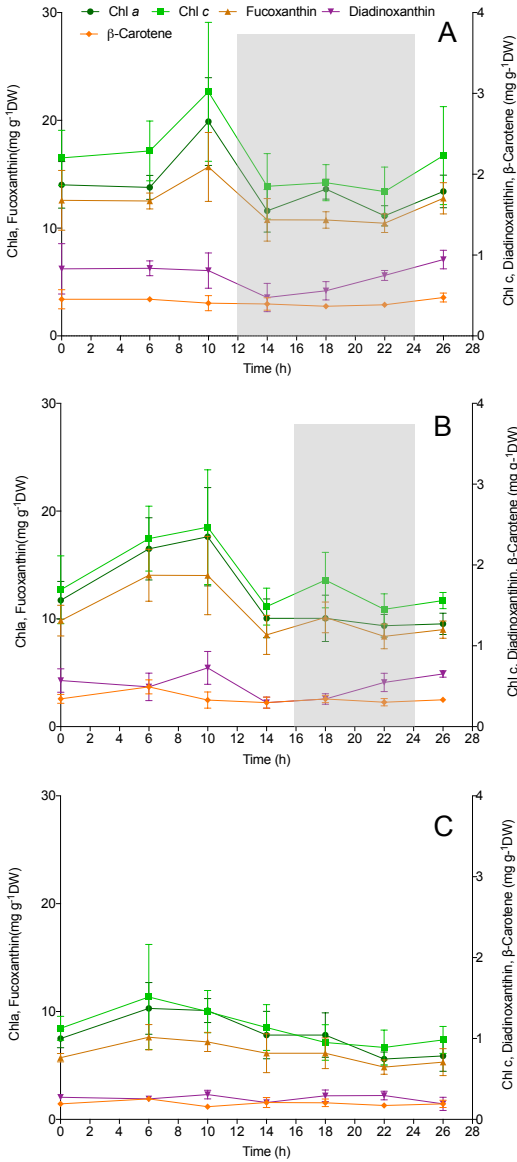


Figure 2. Chlorophyll *a* (*Chla*), Chlorophyll *c* (*Chlc*), Fucoxanthin, Diadinoxanthin and β -Carotene concentrations (mg g^{-1} DW) during 26 hours at different photoperiods: 12:12 (A), 16:8 (B) and 24:0 (C). The gray rectangles represent the dark period during the cycle. All data points presented are the mean ($n=4$) \pm SD (bars).

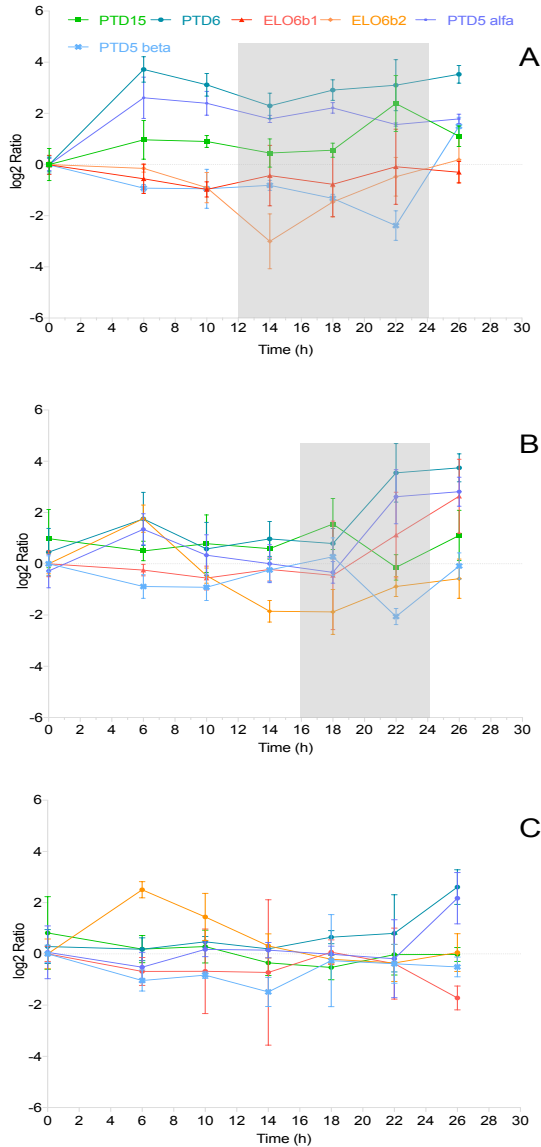


Figure 3. Relative transcript levels (\log_2 Ratio) of *PTD15*, *PTD6*, *ELO6 b1*, *ELO6 b2*, *PTD5* alpha and *PTD5* beta using *RPS*, *H4* and *TBP* as reference genes during 26 hours, at three different photoperiods: 12:12 (A), 16:8 (B) and 24:0 (C). The gray rectangles represent the dark period. Each data point indicates the mean ($n=4$) \pm SD.

6 Discussão dos resultados

No primeiro trabalho, as concentrações de fósforo 1,5 e 3 vezes maiores no meio de cultura não levaram a uma diferença em densidade celular ou biomassa quando comparadas com o tratamento controle (21/1). Em um experimento similar, Yongmanitchai e Ward (1991) não conseguiram diferenças significativas na biomassa quando aumentaram o teor de fosfato 2,5 e 5 vezes a mais do que o tratamento controle.

Esses resultados podem ser explicados devido à importância do nutriente fósforo nos oceanos, o qual pode ser um fator limitante para o crescimento microalgal. Nesse tipo de ambiente, as células tendem a assimilar mais fósforo do que o necessário para o seu crescimento, armazenando o excesso em vacúolos ou plastídios. Esse comportamento é frequentemente chamado de “consumo luxuriante” e usualmente não acarreta em um aumento da biomassa da cultura (REYNOLDS, 2006).

O perfil de ácidos graxos de *P. tricorutum*, independente da razão N/P, é formado principalmente pelos ácidos Mirístico, Palmítico, Palmitoleico, Hexatrienoico e Eicosapentaenoico (aproximadamente 80% do total de ácidos graxos), perfil similar do que é encontrado na literatura, com algumas variações na proporção de classes (CARTENS et al., 1996). Também não foi observado nenhuma diferença significativa entre esses ácidos graxos e as diferentes razões N/P. Em Yongmanitchai e Ward (1991), três tratamentos N/P de aproximadamente 20/1, 8/1 e 4/1 na fase exponencial produziram quantidades similares dos ácidos Palmítico, Palmitoleico, Oleico e Eicosapentaenoico em todos os tratamentos.

Em respeito às mudanças nos teores de SFA, MUFA e PUFA entre as fases de cultivo, um aumento nos ácidos saturados e monoinsaturados (51,72% para 64,86%) ocorreu como o esperado, pois essas classes de moléculas estão mais relacionados com um aumento na síntese de triacilglicerídeos (TAG) na fase estacionária, já que esses TAG servem como fonte de reserva energética em microalgas (HUERLIMANN et al., 2010).

Em relação aos PUFA, mais precisamente EPA, a diminuição na sua concentração da fase exponencial para estacionária (28.64% para 21.89%, respectivamente) pode ser explicado pela função estrutural deste ácido graxo, relacionado principalmente com estabilidade da membrana e fluidez na fotossíntese, a qual é mais intensa durante a fase exponencial. Esse fenótipo (alta concentração de EPA) em *P. tricorutum*, e em outras diatomáceas de climas temperados e ricas em PUFA de cadeia longa, torna-se imporante devido ao ambiente de baixas

temperaturas no qual essas microalgas habitam, o que pode ocasionar a diminuição da fluidez dos seus sistemas de membrana (VALENTINE; VALENTINE, 2004).

O importância do EPA na estrutura de membranas do tilacoide e dinâmica da fotossíntese pode ser comprovado pela alta proporção desse ácido graxo encontrado em glicerolipídios fortemente associados à fotossíntese e membranas de plastídios. Em *P. tricornutum*, de acordo com Abida et al. (2015), EPA é o principal ácido graxo em monogalactosil-diacilglicerídios (MGDG) e fosfatidilcolina (PC) – aproximadamente 40% e 35% do total de ácidos graxos associados, respectivamente – dois dos mais abundantes glicerolipídios junto como os sulfoquinovosil-diacilglicerídio (SQDG), os quais são responsáveis por manter a fluidez de membranas por todas membranas do cloroplasto durante a fotossíntese.

Além disso, a alta proporção de EPA em PC pode explicar a importância do fósforo nos níveis de EPA em *P. tricornutum*, alcançando até 26,8% do total de ácidos graxo em um meio repleto de fósforo, contra somente 6,9% em um meio depletado do nutriente (SIRON et al., 1989). De fato, Abida et al. (2015) descreveram que não foram encontrados PC em cultivos de *P. tricornutum* com uma depleção de fósforo de 10 dias. Contudo, os níveis de EPA foram similares entre culturas controle e depletadas para esse nutriente, demonstrando a importância na manutenção nos níveis desse PUFA em funções estruturais.

Em relação ao segundo trabalho, essa é a primeira vez que uma análise da influência de diferentes fotoperíodos é realizada no perfil de transcrição de genes relacionados à síntese de EPA. De fato, a insaturação dos lipídios constituintes de membranas celulares contribuem enormemente para sua conformação, e portanto, na sua fluidez (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016). No cloroplasto, essas mudanças nos níveis e insaturação de glicerolipídios são fundamentais para o funcionamento correto dos complexos coletores de luz e fotossistemas (DÖRMANN, 2005). Ademais, PUFA como EPA podem estar associados ao transporte de elétrons a distância nas membranas dos tilacoides, uma vez que o aumento de fluidez que ácidos graxos altamente insaturados conferem poderiam aumentar o encontro da plastoquinona com o citocromo b_6/f , os quais estão imersos na bicamada, podendo aumentar a produção de energia na fotossíntese (VALENTINE; VALENTINE, 2004).

De fato, no crescimento microalgal, um dos parâmetros de cultivo mais importantes é a luz, na forma de irradiância, qualidade da luz

(espectro de luz disponível) e no fotoperíodo no qual essas microalgas estão expostas (MASOJÍDEK et al., 2013).

Quando se trabalha com esse parâmetro, é necessário controlar o crescimento das microalgas, já que um aumento na biomassa acarreta em um aumento da turbidez da cultura, o que por sua vez irá implicar no auto-sombreamento do cultivo. De fato, Chauton et al. (2013) analisaram os efeitos do fotoperíodo nos perfis de transcrição de fixação, armazenamento e uso de carbono em *P. tricorutum* em um período de 24 horas, sendo que as culturas foram mantidas em um cultivo contínuo (taxa de diluição de 1.4 d^{-1}) a fim de garantir que houvesse uma homogeneidade na entrada de luz durante todo o ciclo.

Portanto, todas as culturas foram diluídas diariamente para valores similares de biomassa em todos os tratamentos para evitar a possível interferência do auto-sombreamento. Para tanto, a irradiância foi medida diariamente a fim de garantir que todos os tratamentos estariam recebendo a mesma irradiância e atestar que não houve uma diferença muito expressiva nas quantidades de luz antes e depois da diluição.

Após os sete dias de aclimação, as culturas do tratamento sob iluminação constante (24:0) apresentaram valores de irradiância 25% maiores, em média, quando comparados aos outros tratamentos, sem diferenças na concentração de biomassa (antes e depois das diluições).

Esses valores de irradiância maiores podem ser explicados pelas diferenças nos perfis de acumulação de pigmentos entre as culturas sob iluminação constante e os fotoperíodos de 12:12 e 16:8. As células expostas ao fotoperíodo de 24:0 apresentaram concentrações de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *c*) e carotenoides (fucoxantina, diadinoxantina e β -caroteno). Por exemplo, a microalga *Ankistrodesmus falcatus*, quando exposta a diferentes fotoperíodos apresentou valores mais baixos de clorofilas *a*, *b* e carotenoides totais em uma condição de 24:0 em relação aos outros fotoperíodos testados (GEORGE et al., 2014).

Em relação às análises dos níveis de transcrição gênica do primeiro trabalho, o grupo de genes que foram sobre-expressos na fase estacionária - *PTD15*, *ELO6 b2* e *PTD5* beta – não são exclusivamente comprometidos com a biossíntese de EPA, visto que os níveis deste ácido graxo diminuíram nessa fase. Portanto, os seus produtos proteicos podem estar envolvidos em outras etapas da biossíntese de outros ácidos graxos como o ácido Mirístico, no caso das elongases, ou até mesmo outros PUFA, como o ácido Hexadecatetraenoico (C16:4). De fato, a transcrição de *PTD5* beta poderia estar associada à síntese do ácido

Linoleico a partir do ácido Oleico em algumas microalgas. De acordo com Domergue et al. (2002), essas etapas de oxidação e alongação são um tanto inespecíficas, indicando que as enzimas resultantes podem estar comprometidas com a síntese de diversos ácidos graxos.

A relação entre os perfis de transcrição gênica e a concentração de EPA entre os diferentes tratamentos, se existir, é muito complexa. Enquanto dois genes, as duas desaturases “front-end” *PTD6* e *PTD5* alfa são moduladas por pelo menos uma razão N/P, os níveis de EPA não foram afetados por essas condições. Pelo menos em uma razão N/P (21/1), a sobre-expressão de *PTD5* alfa na fase exponencial relativa à fase estacionária coincide na diminuição da concentração de EPA nas mesmas fases.

Além disso, mesmo com a sobre-expressão de alguns genes na fase estacionária, os ácidos graxos intermediários como os ácidos Estearidônico e Eicosatetraenoico não estão presentes na biomassa de *P. tricornutum*. Portanto, um controle pós-transcricional deve existir que regula fortemente a biossíntese de EPA devido a sua importância para a fotossíntese, e por conseguinte o crescimento microalgal (HUERLIMANN et al., 2014).

Em relação ao segundo trabalho, onde a luz é a variável, é necessário encontrar genes de referência que podem ser utilizados como padrões internos de expressão gênica. Siaut et al. (2007) identificaram 13 potenciais genes de referência no genoma de *P. tricornutum*, e os classificaram em quatro grupos de acordo com o seu ΔCq durante 48 horas em um fotoperíodo de 12:12. Portanto, para assegurar resultados de normalizações de qPCR confiáveis, os genes como os ΔCq mais baixos (2 a 2,5) foram usados nos experimentos: *RPS*, *TBP* e *H4*.

Os resultados de expressão gênica do segundo artigo mostram três perfis de expressão relacionados a cada um dos fotoperíodos empregados. Por exemplo, as desaturases *PTD5* alfa, *PTD6* e *PTD15* do tratamento 12:12 foram relativamente sobre-expressas durante todo o período de crescimento. Esse padrão pode ser explicado pela diminuição do período iluminado, fator que poderia estimular a biossíntese de EPA, já que as concentrações de este ácido graxo tendem a aumentar frente a baixas irradiâncias e fotoperíodos com fases claras mais curtas (SUKENIK et al., 1989).

No fotoperíodo de 16:8, os perfis de expressão foram mais estáveis até o final do período escuro, quando os genes *PTD5* alfa, *PTD6* e *ELO6* b2 tiveram sua expressão aumentada, o que poderia demonstrar uma antecipação na produção de EPA visando a um

aumento na quantidade de membranas, antes do início da fase iluminada de crescimento (CHAUTON et al., 2013).

O tratamento 24:0 não apresentou grandes mudanças nos perfis de expressão relativa dos genes associados, principalmente devido à iluminação contínua das culturas, que por sua vez faz com o que o fornecimento de EPA para as membranas do tilacoide seja quase constante, devido ao turnover de MGDG (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2016).

Os dois genes das desaturasas “front-end” *PTD5* alfa e *PTD6* mostraram um padrão de coexpressão independente do fotoperíodo, o que poderia sugerir uma influência importante dos regimes de iluminação nos seus perfis de expressão. De fato, Domergue et al. (2002) caracterizaram esses genes e confirmaram o envolvimento de seus produtos proteicos na biossíntese de EPA, através de ensaios de expressão heteróloga na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Contudo, Chauton et al. (2013) demonstraram que *PTD5* alfa e *PTD6* mostraram perfis de expressão distintos em um fotoperíodo de 16:8, com uma relativa sobre-expressão de *PTD6* no início da fase iluminada, enquanto *PTD5* alfa apresentou picos de expressão, um no início do ciclo e outro logo antes do início do período escuro.

Anteriormente, vários estudos identificaram desaturasas de diversos taxa de microalgas, embora somente alguns destes trabalhos tentaram correlacionar os níveis de expressão dos genes da biossíntese de PUFA com mudanças ambientais nesses micro-organismos.

Um estudo correlacionou os níveis de transcrição de três desaturasas “front-end” envolvidas na biossíntese de ARA com o fenótipo (concentração de ARA na biomassa) durante o crescimento em uma condição de depleção de nitrogênio, na microalga *Parietochloris incisa*. Os autores encontraram que os níveis de expressão gênica acompanhavam o padrão de acumulação de ARA na biomassa durante o cultivo (ISKANDAROV et al., 2010).

Huerlimann et al. (2014), estudaram os efeitos da falta de nitrogênio assim como da fase de crescimento na expressão gênica de quatro desaturasas “front-end” relacionadas à síntese de DHA em *Isochrysis galbana* (TISO). Similar ao primeiro trabalho, os níveis de DHA permaneceram constantes independente da fase de crescimento, presença ou ausência de nitrogênio no meio de cultura, mesmo com relativa sobre-expressão de três desaturasas durante a fase exponencial de cultivo.

Por último, devido aos altos teores de EPA na biomassa de *P. tricornutum*, vários estudos tem se concentrado em tirar vantagem desse

fenótipo para aumentar ainda mais a produção de EPA e até mesmo de outros PUFA de interesse comercial. Peng et al. (2014) clonaram e sobre-expressaram o gene *PTD5* beta in *P. tricornutum*, aumentando a concentração de EPA 1,8 vezes (3 para 5,5% do peso seco) quando comparados à cepa selvagem. Em outro estudo, Hamilton et al. (2014) modificou geneticamente *P. tricornutum* com genes da microalga *Ostreococcus tauri*, produzindo uma cepa transgênica que acumulava DHA em concentrações 8 vezes superior à cepa selvagem.

Referências

ABIDA, H. et al. Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. **Plant Physiology**, v. 167, n. 1, p. 118-136, 2015.

CARTENS, M. et al. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 8, p. 1025-1031, 1996.

CHAUTON, M. S. et al. Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles. **Plant Physiol**, v. 161, n. 2, p. 1034-48, 2013.

DOMERGUE, F. et al. Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 16, p. 4105-4113, 2002.

DÖRMANN, P. Membrane Lipids. In: MURPHY, D. (Ed.). **Plant Lipids. Biology, utilization and manipulation**. Oxford: Blackwell Publishing, CRC Press, 2005. p.123-160.

GEORGE, B. et al. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 367-374, 2014.

HAMILTON, M. L. et al. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of Omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Metabolic Engineering**, v. 22, p. 3-9, 2014.

HUERLIMANN, R. et al. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production.

Biotechnology and Bioengineering, v. 107, n. 2, p. 245-257, 2010.

HUERLIMANN, R. et al. Effects of growth phase and nitrogen starvation on expression of fatty acid desaturases and fatty acid composition of *Isochrysis* aff. *galbana* (TISO). **Gene**, v. 545, n. 1, p. 36-44, 2014.

ISKANDAROV, U. et al. Identification and characterization of delta 12, delta 6, and delta 5 desaturases from the green microalga *Parietochloris incisa*. **Lipids**, v. 45, n. 6, p. 519-530, 2010.

KHOZIN-GOLDBERG, I. et al. Microalgae as a source for VLC-PUFA production. In: NAKAMURA, Y. e LI-BEISSON, Y. (Ed.). **Lipids in plant and algae development**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. cap. 19, p.471-510. (Subcellular Biochemistry).

MASOJÍDEK, J. et al. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A. e HU, Q. (Ed.). **Handbook of microalgal culture. Applied Phycology and Biotechnology**. 2. Oxford: Wiley Blackwell, 2013. cap. 2, p.21-36.

PENG, K. T. et al. Delta 5 fatty acid desaturase upregulates the synthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 35, p. 8773-8776, 2014.

REYNOLDS, C. S. **Ecology of phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. 13, 535 p.

SIAUT, M. et al. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricorutum*. **Gene**, v. 406, n. 1-2, p. 23-35, 2007.

SIRON, R. et al. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 55, n. 1, p. 95-100, 1989.

SUKENIK, A. et al. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. **Journal of Phycology**, v. 25, p. 686-692, 1989.

VALENTINE, R. C.; VALENTINE, D. L. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 5, p. 383-402, 2004.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. Growth of and Omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 419-425, 1991.

7 Conclusões

Com os trabalhos apresentados nesta Tese pode-se concluir que:

- No primeiro estudo, todos os níveis de transcrição foram modulados pela fase de crescimento, sendo que *PTD6* e *PTD5* alfa também foram regulados em uma razão N/P.
- Alguns genes da via podem estar relacionados com a síntese de outros ácidos graxos poli-insaturados.
- A falta de correlação entre os níveis de transcrição e a concentração de EPA poderia indicar algum tipo de controle pós-transcricional que regula a biossíntese desse ácido graxo em *P. tricornutum*.
- No segundo trabalho, cada fotoperíodo gerou um perfil de expressão gênica diferente, corroborando a ideia que os regimes de iluminação influenciam na biossíntese de EPA em *P. tricornutum*.
- Fotoperíodos com menores tempos de fase clara, tendem a levar a sobre-expressão dos genes da via de síntese de EPA.
- As desaturases *PTD5* alfa e *PTD6* apresentaram um padrão de coexpressão em ambos os trabalhos, sendo modulados de forma diferente pelos fotoperíodos e também pela relação N/P.

8 Lista de publicações durante o doutorado

1. GALINDRO, B.; LOPES, R.G.; CHERUBINI, E.; DERNER, R. B.; SOARES, S. R. Growth of microalgae *Nannochloropsis oculata* in a treated effluent of a superintensive shrimp cultivation. **Revista Agrageoambiental**, v. 1, p. 1, 2016.
2. SOARES, ALINE T; MARQUES JÚNIOR, JAIR G.; LOPES, RAFAEL G.; DERNER, ROBERTO B.; ANTONIOSI FILHO, NELSON R. Improvement of the extraction process for high commercial value pigments from *Desmodesmus* sp. microalgae. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Impresso), v. 00, p. 00, 2016.
3. MENEZES, RAFAEL SILVA; SOARES, ALINE TERRA; MARQUES JÚNIOR, JAIR GONZALEZ; LOPES, RAFAEL GARCIA; ARANTES, RAFAEL FONSECA ; DERNER, ROBERTO BIANCHINI; FILHO, NELSON ROBERTO ANTONIOSI. Culture medium influence on growth, fatty acid, and pigment composition of *Choricystis minor* var. *minor*: a suitable microalga for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, p. 1-8, 2016.
4. MAGNOTTI, CAIO; LOPES, RAFAEL; DERNER, ROBERTO; VINATEA, LUIS. Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. Part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production. **Aquaculture Research** (Print), v. n/a, p. n/a-n/a, 2015.
5. MAGNOTTI, CAIO; LOPES, RAFAEL; DERNER, ROBERTO; VINATEA, LUIS. Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. Part II: *Artemia franciscana* biomass production fed microalgae grown in reused BFT water. **Aquaculture Research** (Print), v. n/a, p. n/a-n/a, 2015.
6. OZORIO, R. A.; LOPES, R.G.; GOES, B. S.; SILVA, C. P.; DERNER, R. B.; FRACALOSSO, D. M. Growth and enzymatic profile of the white shrimp fed with *Porphyridium cruentum* extract. **Boletim do Instituto de Pesca** (Online), v. 41, p. 123-131, 2015.
7. MENEZES, R. S.; SOARES, A. T.; LOPES, R. G.; MAGNOTTI, C.; DERNER, R. B.; MORI, C. C.; VIEIRA, A. A. H.;

ANTONIOSI FILHO, N. R. Evaluation of fatty acid composition of the microalgae *Choricystis minor* var. *minor* according to two different nutrient feeding strategies. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 7, p., 2015.

8. NEVES, F. F.; DERNER, R. B. ; LISBOA, H. ; RORIG, L. R. ; LOPES, R.G. ; VIEIRA, A. S. ; LUCIO, M. J. Efeito do Uso de Efluente Doméstico Tratado, como meio de cultura, sobre o crescimento e produtividade no cultivo de *Chlamydomonas* sp. isolada de lixiviado de aterro sanitário. **Tecno-lógica** (Santa Cruz do Sul . Online), v. 17, p. 30-37, 2014.

9. SOARES, ALINE TERRA; DA COSTA, DAYANE CRISTINE; SILVA, BRUNA FERREIRA; LOPES, Rafael Garcia; DERNER, ROBERTO BIANCHINI; ANTONIOSI FILHO, NELSON ROBERTO. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil Extraction methods and direct biomass transesterification. **BioEnergy Research**, v. 7, p. 1035-1044, 2014.

Nesse período também foram publicados:

- 1 Trabalho completo em Congresso Internacional
- 2 Resumos expandidos em Congresso Nacional e Internacional
- 21 Resumos em Congressos, Simpósios Nacionais e Internacionais.