

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Raissa Estrela Curado

**“Análise dos efeitos da privação de nitrogênio na microalga
Neochloris oleoabundans, visando a produção de cadeias
carbônicas lipídicas”**

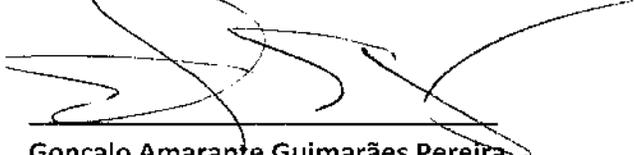
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE, NA ÁREA DE: GENÉTICA
DE MICROORGANISMOS.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Co-orientadora: Dra. Laudiene Evangelista Meyer

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO

DEFENDIDA PELA ALUNA RAISSA ESTRELA CURADO E ORIENTADA PELO PROF.DR.



Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Campinas 2001

1001

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C922a Curado, Raissa Estrela, 1986-
Análise dos efeitos da privação de nitrogênio na
microalga *Neochloris oleoabundans*, visando a produção
de cadeias carbônicas lipídicas / Raissa Estrela Curado.
– Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Coorientador: Laudiene Evangelista Meyer.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Microalga. 2. Plantas – Efeito do nitrogênio. 3.
Biodiesel. 4. *Neochloris oleoadundans*. 5. Genoma
de planta. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães,
1964-. II. Meyer, Laudiene Evangelista. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of *Neochloris oleoabundans* under nitrogen starvation,
aiming the production of lipid carbon chains

Palavras-chave em Inglês:

Microalgae

Plants – Effect of nitrogen on

Biodiesel fuels

Neochloris oleoabundans

Plant genome

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Paulo Luiz de Andrade Coutinho

Marcelo Brocchi

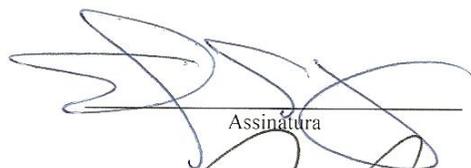
Data da defesa: 04-07-2011

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, quatro de julho de 2011

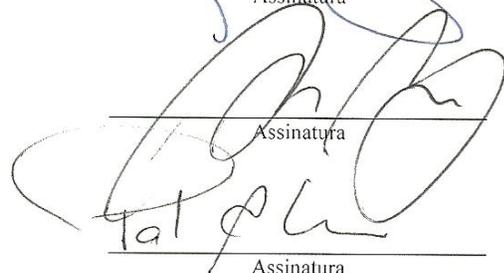
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Dr. Paulo Luiz de Andrade Coutinho



Assinatura

Dr. Jorge Maurício Costa Mondego

Assinatura

Dra. Silvia Kazue Missawa

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Assinatura

Dedico este trabalho a minha mãe,
Heloisa Helena Estrela e minha
orientadora Laudiene Evangelista
Meyer.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira pela competência com que coordena o Laboratório de Genômica e Expressão, juntamente com a Eliane Laranja Dias e Silvia Kazue Missawa. Obrigada por me acolher desde 2007 no LGE.

À minha orientadora Laudiene Evangelista Meyer que deixou a vida tão cedo. Obrigada pelos ensinamentos e pelas boas lembranças, você foi luz na vida de muitas pessoas.

Ao ex-orientador de iniciação científica Jorge Maurício Costa Mondego por despertar o interesse pela ciência.

Aos colegas do “Grupo Algas” do LGE pelo apoio mútuo: Isabella Toni, Bruna Favararelli, Gustavo de Almeida, Rodrigo Gurdos e Lucas Parizzi.

Aos colegas da Braskem S.A. que acreditaram no projeto e sempre nos apoiaram.

A todos os amigos pessoais e colegas do LGE que estiveram presentes nesses anos de trabalho e contribuíram de diversas maneiras. Em especial: Rafaella Carneiro Pereira, Marianna Favaro, Larissa Yuri, Sarah Azoubel Lima, Raiza Balbino, Cecília Barbosa, Tais Herig, Gleidson Teixeira, Bruno Vaz e João da Costa Britto Neto.

Aos demais colaboradores que contribuíram com seu tempo, ensinamentos e equipamentos, um sincero obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	7
LISTA DE ABREVIACÕES.....	9
RESUMO.....	10
CAPÍTULO I – PANORAMA ENERGÉTICO.....	13
CAPÍTULO II – MICROALGAS COMO FONTE DE ENERGIA.....	26
CAPÍTULO III – DESCRIÇÃO DO PROJETO, MATERIAL E MÉTODOS.....	35
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO: CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE.....	47
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO: <i>Neochloris oleoabundans</i> E O MANEJO DE NUTRIENTES.....	64
CAPÍTULO VI – RESULTADOS E DISCUSSÃO: GENOMA DE <i>Neochloris oleoabundans</i>	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Evolução das fontes de energia	15
Figura 2. Panorama energético mundial (estimativas para 2010)	16
Figura 3. Produção e consumo de energia primária	17
Figura 4. Dinâmica dos preços do barril de petróleo ao longo do tempo	20
Figura 5. Consumo de energia final global (2008)	21
Figura 6. Oferta interna de energia no Brasil.....	21
Figura 7. Produção de commodities para mercado alimentício <i>versus</i> energético	23
Figura 8. Exemplo de “fazenda de microalgas” com sistema aberto	25
Figura 9. Teoria da endossimbiose	27
Figura 10. Produção de biocombustíveis de 3ª geração a partir de microalgas	28
Figura 11. Representação do modelo de produção de cadeias carbônicas lipídicas em três etapas.....	31
Figura 12. Síntese de lipídeos no cloroplasto de plantas e algas.....	32
Figura 13. Esquema de contagem de células em câmara de Neubauer.....	39
Figura 14. Estratégia experimental para transferência de meio de cultivo	40
Figura 15. Curva típica gerada por fluorimetria.....	42
Figura 16. Cultivos saudáveis de <i>Neochloris oleoabundans</i> em erlenmeyers de volumes variados	50
Figura 17. Curva padrão de <i>Neochloris oleoabundans</i>	51
Figura 18. Crescimento populacional típico de microorganismos unicelulares como bactérias, leveduras e microalgas.....	51
Figura 19. Curvas de crescimento de <i>Neochloris oleoabundans</i> em meio BBM	53
Figura 20. Curva de crescimento de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	55
Figura 21. Crescimento de <i>Neochloris oleoabundans</i> em cultivo contínuo e cultivo alimentado.....	56
Figura 22. Curvas de crescimento de <i>Neochloris oleoabundans</i> em 5 e 10mM de NaNO ₃ inicial.....	57
Figura 23. Perfil de ácidos graxos de <i>Neochloris oleoabundans</i> cultivada em 5mM e 10mM de NaNO ₃	58
Figura 24. Fluorimetria de <i>Neochloris oleoabundans</i> cultivada em 5mM e 10mM de NaNO ₃ inicial.....	59
Figura 25. Valores de tempo de duplicação das curvas feitas com <i>Neochloris oleoabundans</i> cultivada em meio BBM padrão ao longo do período de mestrado.....	60

Figura 26. Crescimento de <i>Neochloris oleoabundans</i> em diferentes concentrações iniciais de NaNO ₃	62
Figura 27. Fluorimetria de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e <i>Neochloris oleoabundans</i> em privação de nitrogênio e no meio controle (mesmo meio)	67
Figura 28. Fluorimetria de <i>Neochloris oleoabundans</i> em diferentes concentrações de NaNO ₃	68
Figura 29. Fluorimetria de <i>Neochloris oleoabundans</i> em diferentes concentrações de NaNO ₃ em escala menor	69
Figura 30. Efeito de diferentes concentrações de fósforo sobre <i>Neochloris oleoabundans</i>	71
Figura 31. Manejo conjunto de nitrogênio e fósforo.....	72
Figura 32. Área dos picos gerados por fluorimetria compreendidos entre 540nm e 640nm, correspondendo à presença de lipídeos apolares na amostra.....	73
Figura 33. Representação esquemática da via de biossíntese de ácidos graxos em plantas e algas.....	75
Figura 34. Gel de agarose contendo RNA total de <i>Neochloris oleoabundans</i> de duas amostras e a os PCRs de padronização para Real-time PCR.....	76
Figura 35. Expressão relativa de KAS II e KAS III em privação de nitrogênio através de Real-time PCR.....	77
Figura 36. Feedback negativo sobre a via de biossíntese de ácidos graxos.....	78
Figura 37. Esquema da classificação dos <i>contigs</i> para montagem do genoma.....	83
Figura 38. Histograma 2D da distribuição de scaffolds agrupados em Algas (verde), Bactéria (azul) e No-hits (preto) com base em conteúdo GC e cobertura médios.....	84
Figura 39. Porcentagem de sequências de diferentes origens encontradas no genoma.....	84
Figura 40. Busca da sequência de METH no genoma de <i>N. oleoabundans</i>	87
Figura 41. Busca da sequência de METE no genoma de <i>Neochloris oleoabundans</i>	88
Figura 42. Comparação da sequência de cDNA de METE de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> contra o NCBI.....	89
Figura 43. Busca da sequência de MCM no genoma de <i>Neochloris oleoabundans</i>	90
Figura 44. Busca da sequência de RNR II no genoma de <i>Neochloris oleoabundans</i>	91
Figura 45. tBlastn da RNR tipo I (independete de B12) de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> contra o genoma de <i>Neochloris oleoabundans</i>	92
Tabela 1. Composição do meio Bold's Basal Medium	37
Tabela 2. Fórmulas para obtenção de taxas de crescimento, divisões por dia e tempo de geração.....	48
Tabela 3. Iniciadores empregados no Real-time PCR.....	75
Tabela 4. Tabela mostrando a existência de genes dependentes de B12 no genoma de 15 espécies de algas.....	93

LISTA DE ABREVIACÕES

B12 - Cobalamina ou vitamina B12

BP - British Petroleum

cDNA - DNA complementar

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

GC - Guanina e Citosina

LGE - Laboratório de Genômica e Expressão

MCM - Metilmalonil-CoA mutase

METH - Metionina sintase dependente de cobalamina

METE - Metionina sintase independente de cobalamina

RNA - Ácido Ribonucléico

RNR - Ribonucleotídeo redutase

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

RESUMO

A necessidade do desenvolvimento de alternativas energéticas renováveis, limpas e de baixo custo, capazes de substituir o “petrodiesel” sem impactar a produção de alimentos, é a principal motivação para o desenvolvimento do projeto. Entre as alternativas, o cultivo de microalgas tem sido recorrentemente relatado como muito promissor. Microalgas são espécies unicelulares fotossintetizantes capazes de acumular lipídeos naturalmente. Entretanto, ainda não há cepas desenvolvidas para o uso industrial, havendo diversas barreiras tecnológicas a serem vencidas, como os altos custos de implantação e a dificuldade de encontrar organismos que aliem velocidade de crescimento e boa produtividade lipídica. Para o desenvolvimento do projeto selecionamos a espécie de microalga *Neochloris oleoabundans* devido à sua capacidade naturalmente superior em acumular lipídeos. O principal objetivo foi identificar estímulos ambientais capazes de induzir maior produção e acúmulo de cadeias carbônicas lipídicas nessa espécie e, então, iniciar análises moleculares nessas situações. Os primeiros cultivos de *N. oleoabundans* caracterizaram-se pelo crescimento muito lento nos diversos meios autotróficos testados, porém, ao final do projeto, percebemos que os cultivos cresciam com velocidade muito superior às culturas iniciais. Ao compilar os dados de crescimento obtidos nesses dois anos, vimos que as taxas de duplicação de *N. oleoabundans* foram elevadas em cerca de seis vezes nesse período. Acreditamos que houve seleção artificial de células mais velozes à medida que repicávamos os cultivos a fim de iniciar culturas novas. Para identificar condições capazes de induzir maior acúmulo lipídico, *N. oleoabundans* foi submetida a situações de estresse como privação de fósforo e nitrogênio. Observamos que a privação de nitrogênio foi capaz de desencadear aumento de teor lipídico muito expressivo. Então, sequenciamos o genoma e averiguamos a expressão gênica de algumas enzimas da via de biossíntese de ácidos graxos em privação de nitrogênio. Observamos também que cultivos feitos em meio heterotrófico mostravam-se rapidamente contaminados. A montagem do genoma pode dar indícios da natureza dessa contaminação recorrente, pois foram encontradas sequências de uma bactéria do gênero *Brevundimonas*. Ao investigar esse contaminante vimos que o mesmo pode estar em simbiose com a microalga, há relatos na literatura sobre

simbioses dessa natureza, onde o procarioto fornece vitamina B12 e a microalga, matéria orgânica para o crescimento do mesmo. Encontramos enzimas dependentes dessa vitamina como cofator no genoma de *N. oleoabundans*, indicando que pode haver uma simbiose entre esses organismos. Devido aos bons resultados obtidos acreditamos que o estudo e manipulação a nível molecular dessa espécie podem torná-la potencialmente aplicável na indústria. O entendimento do mecanismo molecular de acúmulo lipídico sobre estresse, aliado ao potencial de seleção artificial de cepas velozes revelado, permite gerar conhecimento suficiente para agrupar em uma única espécie rápido crescimento e teor lipídico elevado.

RESUME

Coal, petroleum and natural gas are cheap and may not run out soon. However, considering political and environmental implications associated with them, there appears to be no net economic benefit in its use. Therefore, sustainable alternatives are really necessary due to the global growing demand of energy. Among the alternatives, cultivation of microalgae has been reported as a promising technology. Algae use sunlight to produce biochemical energy via photosynthesis and its oil productivity and growth rates greatly exceeds that of vascular plants. Unlike the existing crop-derived biofuels, algae fuels can be produced without encroaching on food cropland. The technology is being intensively investigated by nearly every major and startups oil companies nowadays. However, there are no species developed for industrial use and there are several technological barriers to overcome. In this study we investigated the microalga *Neochloris oleoabundans*, selected for its naturally higher ability to accumulate lipids. Initially, *N. oleoabundans* growth rates were very low. We decreased by six times the cell doubling time, we believe that occurred artificial selection of faster growing cells during the master's period. Nitrogen starvation led to great increases in cellular lipid content. Real-time PCR experiments show that some key enzymes of fatty acid biosynthesis are differentially expressed in nitrogen starved cultures. The genome of *N. oleoabundans* was sequenced using *Solexa*® technology and preliminary analysis show the presence of a bacterium associated with the microalga. We believe that there is a symbiotic relationship between them, since the alga needs vitamin B12 despite being not capable of producing it. Our analysis show that *N. oleoabundans* is a very promising strain. The excellent response to nitrogen starvation and knowledge acquired with genomic approach led us to a better understanding of *N. oleoabundans* metabolism, indicating that this specie may be suitable for industrial application.

CAPÍTULO I

PANORAMA ENERGÉTICO

1. PANORAMA ENERGÉTICO MUNDIAL

1.1. Evolução das fontes de energia

1.2. Panorama energético atual e perspectivas

1.3. Problemática dos combustíveis fósseis

2. ALTERNATIVAS

2.1. Biocombustíveis de 1ª Geração

2.2. Biocombustíveis de 2ª Geração

2.3. Biocombustíveis de 3ª Geração

1. PANORAMA ENERGÉTICO MUNDIAL

1.1. Evolução das fontes de energia

Entende-se por energia primária aquela oriunda de fontes providas pela natureza na sua forma direta, como o petróleo, gás natural, carvão mineral, energia hidráulica e biomassa. A maior parcela da energia primária é consumida pelos centros de transformação (refinarias de petróleo, plantas de gás natural e usinas hidrelétricas) onde é convertida em energia secundária (óleo diesel, gasolina, coque de carvão mineral, eletricidade) e direcionada ao consumo final.

As fontes de energia e diferentes tecnologias evoluem com o tempo e influenciam umas às outras. Em 1850, por exemplo, a combustão da madeira era amplamente utilizada; já em 1900, com a evolução da mineração, o carvão havia passado a predominar e a impulsionar a industrialização de alguns países. Neste período, o crescente acesso à energia possibilitou o desenvolvimento de economias industriais e por sua vez, a modernização e riquezas por eles geradas resultaram no aumento da demanda energética. Na década de 1950 o petróleo começou a passar à frente do carvão devido ao aumento da aquisição de veículos e o surgimento das companhias aéreas comerciais que geraram novas necessidades por combustíveis líquidos. Na mesma época, a energia hidrelétrica passou a ser utilizada e o gás natural ajudou a atender às necessidades industriais e de aquecimento. De 1950 a 2000, vimos a introdução da energia nuclear e a primeira aparição significativa dos combustíveis renováveis modernos. Projeções mostram que pelo menos até 2030 as fontes de energia primária continuarão a se diversificar, importante para reforçar a segurança energética reduzindo o risco de interrupções de fornecimento de uma fonte individual (Rodrigue, 2011). A Figura 1 ilustra de modo geral essa evolução das fontes de energia.

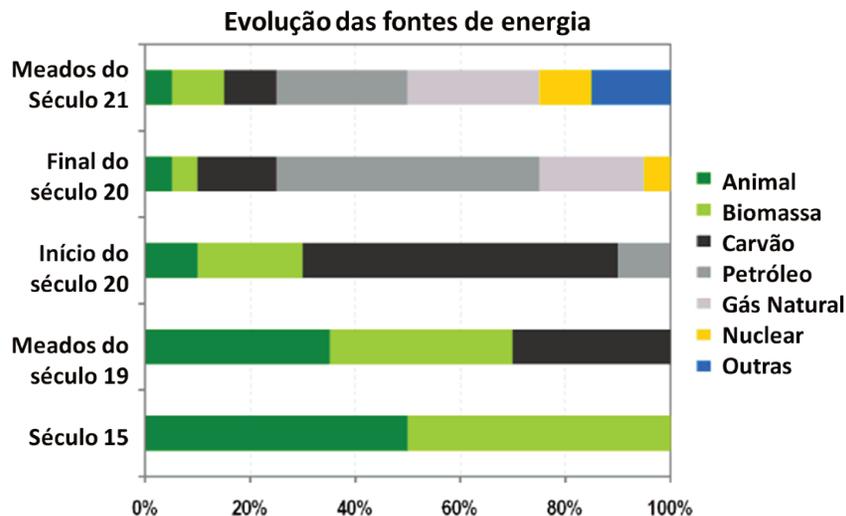


Figura 1. Evolução das fontes de energia. O termo “Outras” refere-se à hidráulica, solar, eólica e biomassa moderna. Adaptado de Rodrigue (2011).

Dentre as fontes primárias de energia, o petróleo, o carvão mineral e o gás natural compõem os recursos fósseis. Essa denominação sugere o tempo demandado para a formação dos mesmos, sendo que as reservas atualmente exploradas foram formadas há mais de 100 milhões de anos. Portanto, esses recursos são considerados não renováveis em escala de tempo humana, ainda que em escala geológica sua formação seja contínua (Tissot e Welte, 1984). Constituídos basicamente por carbono e hidrogênio, são originados a partir da matéria orgânica de organismos mortos, como protozoários, celenterados, crustáceos e microalgas que se depositam no assoalho de oceanos e lagos e sofrem sedimentação ao longo do tempo. Esse processo submete a matéria orgânica à pressão e temperatura muito elevadas, resultando na conversão da matéria orgânica em petróleo, gás natural e carvão (Tissot e Welte, 1984).

Por serem não renováveis em escala de tempo humana, acredita-se que as reservas fósseis serão esgotadas em um futuro próximo e apesar de controvérsias do passado, hoje esta é uma realidade cada vez menos contestada. A BP (British Petroleum) em seu estudo “Revisão Estatística de Energia Mundial” de 2004 afirma que nos moldes atuais de consumo as reservas de petróleo durariam em torno de 41 anos e as de gás natural 67 anos (British Petroleum), enquanto as de carvão, 120 anos (World Coal Association).

1.2. Panorama energético atual e perspectivas

O petróleo constitui a fonte de energia primária mais importante no cenário atual; suas reservas já conhecidas, assim como as que poderão ser ainda descobertas, dão ao mesmo uma extraordinária importância que provavelmente se estenderá por todo século XXI. Atualmente, aproximadamente 80% da energia consumida no mundo é proveniente de combustíveis fósseis (Figura 2).

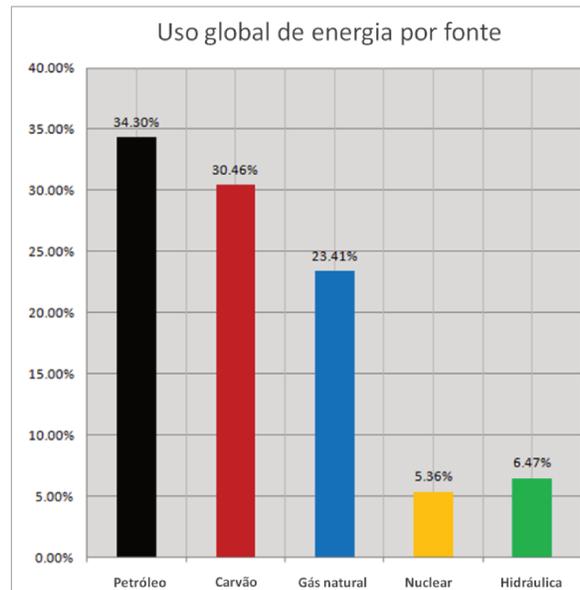


Figura 2. Panorama energético mundial (estimativas para 2010). Adaptado de BP Statistical Review of World Energy.

Segundo a Agência Internacional de Energia (IEA), os maiores produtores de energia primária são os Estados Unidos, Rússia e China, com 39 % da produção mundial, seguidos de Arábia Saudita e Canadá. Juntos, estes cinco países concentram aproximadamente 50% da produção de energia primária do mundo. Os maiores consumidores são também os Estados Unidos, China e Rússia com 41%; seguidos por Japão e Alemanha, totalizando 51%. A Figura 3 mostra os valores de produção e consumo em trilhões de BTU por ano (1 BTU = 1,056kJ).

Produção anual total (trilhões de BTU)			Consumo anual total (Trilhões de BTU)		
	País			País	
1	 Estados Unidos	71,503.62	1	 Estados Unidos	101,553.86
2	 China	70,796.18	2	 China	77,807.73
3	 Rússia	53,971.33	3	 Rússia	30,354.82
4	 Arabia Saudita	23,806.95	4	 Japão	22,473.19
5	 Canadá	19,421.73	5	 Índia	19,093.68
6	 Índia	13,048.46	6	 Alemanha	14,166.17
7	 Iran	12,993.74	7	 Canadá	13,752.63
8	 Austrália	11,880.51	8	 França	11,206.47
9	 Indonésia	10,930.06	9	 Brasil	10,130.44
10	 Dinamarca	9,941.07	10	 Coreia do Sul	9,647.06
11	 México	9,919.91	11	 Reuni Unido	9,460.27
12	 Brasil	8,315.47	12	 Itália	7,968.83
13	 Venezuela	7,968.47	13	 Iran	7,916.02
14	 Emirados Árabes Unidos	7,914.94	14	 México	7,587.90

Figura 3. Produção e consumo de energia primária. Para os cálculos são considerados: petróleo, gás natural, carvão e eletricidade. Fonte: IEA 2009.

O Brasil ocupa o 9º lugar no ranking de países consumidores e ao mesmo tempo é um fornecedor importante de óleo e gás para a América do Sul, ficando em 12º lugar no ranking de produção. Em termos de eletricidade, o país é o 9º maior produtor do mundo e o 4º maior produtor de energia a partir de fontes renováveis, segundo o Ministério de Minas e Energia (MME 2011).

O crescimento da economia mundial é a principal influência na demanda de energia. Projeções mostram que até 2030 é previsto crescimento econômico de 3,2% ao ano, suavemente menor que o ocorrido nas três décadas anteriores (ExxonMobil 2008). Neste período estima-se que o PIB aumentará em quatro vezes e a população mundial em quase duas. A taxa de crescimento da demanda energética está estimada em 1,2% ao ano; isso significa que em 2030 o consumo de energia será 35% maior que o reportado em 2005 (ExxonMobil 2008). Os países em desenvolvimento continuarão crescendo rapidamente e responderão por dois terços deste aumento; os setores de transporte e geração de energia absorverão grande parte do crescimento desta demanda. Em um cenário sem alteração da matriz energética mundial, os combustíveis fósseis continuariam suprindo aproximadamente 90% da nova demanda (Biodieselbr 2011).

Ao analisar o atual panorama energético, bem como as tendências previstas, notam-se muitos aspectos positivos, como recuperação e crescimento econômicos, melhores padrões de vida, redução na pobreza e novas tecnologias. No entanto, também vemos um enorme desafio: como atender às necessidades de uma população global crescente e ao mesmo tempo reduzir o impacto do uso da energia sobre o meio ambiente.

1.3. Problemática dos combustíveis fósseis

É indiscutível que o uso destes recursos teve grande impacto positivo na evolução do homem a nível social, tecnológico e econômico, uma vez que o desenvolvimento econômico está intimamente atrelado ao consumo de energia. Entretanto, há dois aspectos negativos muito fortes acerca do uso de combustíveis fósseis: o apelo ambiental e a questão econômica.

Aspecto ambiental

O principal problema ecológico resultante da atual política energética é o agravamento do efeito estufa e, apesar de outros gases também contribuírem, o CO₂ é o de maior importância. Nos últimos dois séculos os níveis atmosféricos deste gás aumentaram em 30% (Coutinho 2004) e calcula-se que atualmente a queima de combustíveis fósseis colabore com 7,9 Gt de carbono emitido por ano, cerca de 30% das emissões totais (Hughes e Benemann, 1997). Estes números vêm preocupando as autoridades, uma vez que o retorno do carbono para as reservas fósseis é cerca de 600 vezes menor que a liberação (Hughes e Benemann, 1997).

O agravamento do efeito estufa, que naturalmente impede o escape das ondas de calor, gera o fenômeno do aquecimento global. Calcula-se que a temperatura média de superfície da Terra já tenha subido 0,8°C desde a era pré-industrial e a previsão dos especialistas não é otimista, o IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) estima que as temperaturas globais devam aumentar entre 1,1 e 6,4 °C até 2100.

Autoridades mundiais reconhecem a necessidade de redução substancial das emissões de gases de efeito estufa (GEE), tendo firmado diversos acordos nos últimos anos. Em 1997 foi dado o 1º passo com o

Protocolo de Kyoto. Na ocasião estabeleceu-se a meta de redução das emissões em 5,2% entre 2008 e 2012 em relação às taxas de 1990 (Simeonova e Diaz-Bone 2005). Em 2009 a ONU reuniu em Copenhague (Copenhagen Conference of the Parties) os representantes do G-8 e estes se comprometeram a colaborar com a redução das emissões globais em 50% até 2050 (ano base, 1990) e limitar o aumento da temperatura global em no máximo 2°C, tendo como base a era pré-industrial. Em setembro do mesmo ano, dirigentes do G-20 encontraram-se em Pittsburg, EUA e comprometeram-se a racionalizar e abandonar, em médio prazo, a política de subsídios a energias fósseis, uma vez que a mesma distorce o mercado e pode atrasar o desenvolvimento de alternativas renováveis (International Energy Agency em “World Energy Outlook 2010”).

Aspecto econômico

Sabe-se que a economia mundial requer suprimentos cada vez maiores de petróleo a um preço razoável e o Oriente Médio (detentor de quase 60% das reservas) ainda pode suprir essa demanda. Por um século, desde a descoberta de petróleo na Pérsia antes da Primeira Guerra, o ocidente têm repetidamente promovido intervenções no Oriente Médio para garantir a sobrevivência de governos dedicados à produção e exportação de petróleo. Especialistas acreditam que sem tais intervenções a expansão das economias ocidentais após a Segunda Guerra e a atual abundância das sociedades industriais seria inconcebível (Klare 2011).

Desde a Segunda Guerra Mundial a comercialização de petróleo enfrentou algumas crises principais. Algumas causadas por conflitos envolvendo países produtores, outras por movimentos especulativos a nível global, como a crise de 2008/09. A Figura 4 mostra a dinâmica dos preços do barril desde 1970 e percebe-se claramente a influência dessas crises no valor do combustível (Biodiesel BR).

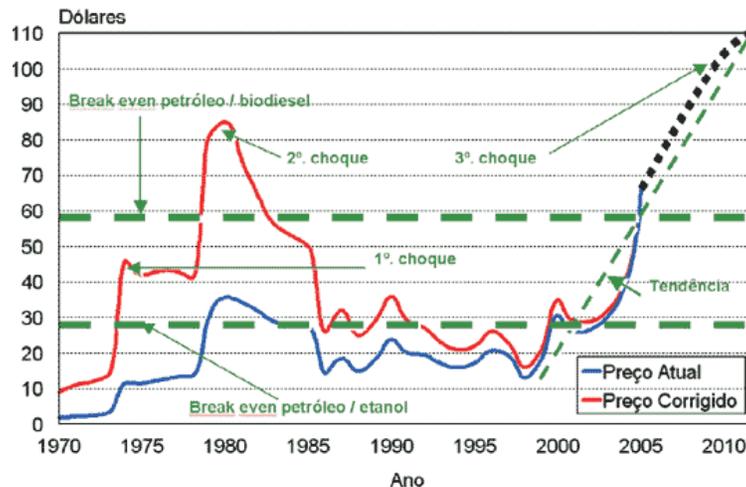


Figura 4. Dinâmica dos preços do barril de petróleo ao longo do tempo. Fonte: Biodieselbr.com

À medida que surgiram esses primeiros percalços, veio crescendo a consciência de que a economia do petróleo, do gás e do carvão era instável, insegura e insustentável. Mas foi a última crise econômica mundial (2008/09) que evidenciou a urgência de dar início em larga escala à geração de uma economia verde.

A realidade é que atualmente nos confrontamos com diversas crises – financeira, econômica, energética, alimentar e climática – que necessitam ser enfrentadas simultaneamente. De forma otimista, pode-se dizer que os aumentos do preço de petróleo, assim como a consciência dos efeitos do aquecimento global, criaram o ambiente necessário para o início da transição da economia que hoje é baseada na energia de combustíveis fósseis, para um sistema baseado em energia limpa, renovável e eficiente.

2. ALTERNATIVAS

O novo cenário energético vem modificando o enfoque das autoridades políticas e das principais empresas petrolíferas do mundo. É o caso, por exemplo, da British Petroleum (agora chamada “Beyond Petroleum”), ExxonMobil, Shell e a própria Petrobras, que tornaram públicas suas estratégias de investir no desenvolvimento de energias renováveis, provenientes de recursos como sol, vento, chuva, marés, água, calor e biomassa. Já se pode perceber a inserção dessas alternativas na matriz energética mundial.

Em 2008, 19% do suprimento mundial teve origem renovável (Figura 5); a maior parte através da combustão de biomassa (uso tradicional) que, apesar de não constituir a forma mais nobre de aproveitamento da mesma, é mais limpa que a fóssil. Dentre as opções, a mais promissora é o uso moderno da biomassa, com a produção de cadeias carbônicas portáteis, como etanol e biodiesel.

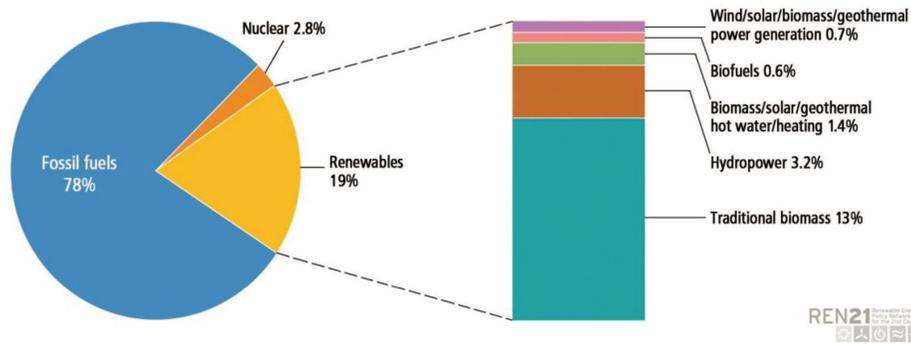


Figura 5. Consumo de energia final global (2008). Fonte: REN21 (2010).

No Brasil, antes mesmo de o efeito estufa e o aquecimento global se transformarem em uma das principais preocupações do século XX, os dois choques do petróleo da década de 70 levaram o país a aumentar o uso de fontes renováveis, como energia hidráulica e produtos da cana-de-açúcar, como álcool e bagaço. O país se destaca entre as economias mundiais pela elevada participação das fontes renováveis em sua matriz energética (Figura 6) e parte da superioridade brasileira explica-se por alguns privilégios da natureza, como bacia hidrográfica favorável e clima tropical ideal à produção de biomassa vegetal.

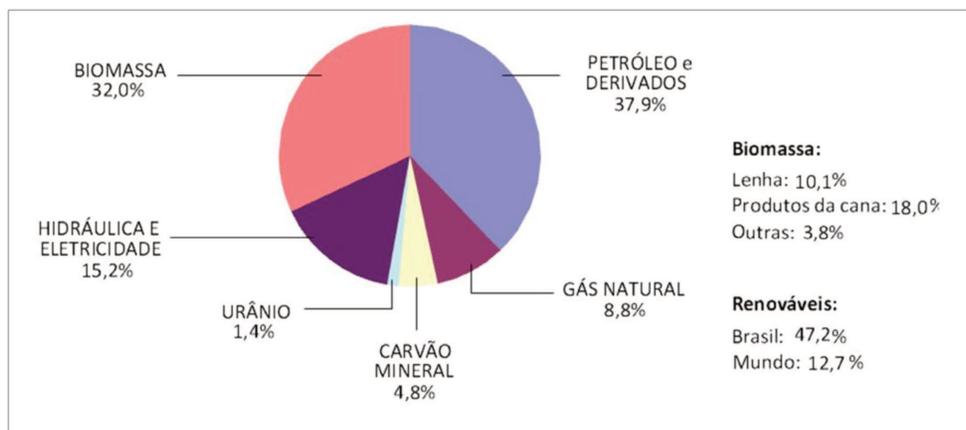


Figura 6. Oferta interna de energia no Brasil. Fonte: Resenha Energética Brasileira 2010/Ministério de Minas e Energia.

Parte da grande representatividade que as fontes renováveis têm na nossa matriz deve-se ao etanol; somos o único país a utilizá-lo em larga escala, mais de 15% da frota nacional pode rodar com álcool (Favaro 2007). Recentemente, incentivos à produção de biodiesel vêm possibilitando a adição crescente desse biocombustível ao derivado do petróleo. Tudo indica que a indústria brasileira tem ótimas condições de se tornar uma fornecedora de energia limpa em escala global em médio prazo.

Por fim, é consenso que a biomassa moderna é a única alternativa capaz de “refazer o barril de petróleo”. Esforços têm sido direcionados para conseguir sua transformação praticamente total em energia já que o rendimento da biomassa, da forma que é processada atualmente, ainda não é ideal. Acredita-se que através de abordagens de aproveitamento residual o rendimento possa ser multiplicado.

2.1. Biocombustíveis de 1ª Geração

Os combustíveis substitutos para o petrodiesel devem atender aos critérios básicos de equivalência econômica e factibilidade técnica, devem ser renováveis e obtidos a partir de matéria prima abundante e de oferta estável. Dessa forma, os biocombustíveis de 1ª geração surgiram como possível alternativa. Representados pelo bioetanol e biodiesel, são provenientes de matéria prima renovável, em sua maioria vegetal, não exigem a substituição da infraestrutura existente e podem ser obtidos a partir de diversas fontes de biomassa.

O processo biológico básico mais importante para a produção desses combustíveis é a fixação do CO₂ atmosférico em esqueletos carbônicos, promovido por organismos fotossintetizantes. A energia química é alocada no vegetal sob a forma de diversas moléculas, como lignina, celulose, amido e lipídios (Schenk et al., 2008), sendo que o processo de produção dos biocombustíveis de 1ª geração consiste em extrair da biomassa os compostos primários de interesse e então transformá-los em produto final. Para o etanol, a matéria prima é o amido ou sacarose; para o biodiesel, os óleos vegetais.

Nos últimos anos, análises cautelosas têm mostrado uma face pessimista em relação a essa alternativa, acredita-se que a tecnologia da forma que conhecemos hoje não seria capaz de substituir o petróleo. São vários os percalços acerca da produção desses biocombustíveis: quando feitos a partir de

milho, soja ou canola ocorre um impacto negativo nos preços de alimentos e quando baseados em extrativismo, ameaçam a biodiversidade (palma e mamona, por exemplo); seu balanço energético e de carbono não é satisfatório devido às técnicas de agricultura convencional, além da dependência de tecnologias de conversão relativamente ineficientes, como fermentação ou tratamentos químicos (Biodieselbr 2008). Por fim, áreas férteis muito extensas seriam necessárias para atender a demanda, o que é um fator de complicação no cenário internacional. A Figura 7 ilustra outra face do problema, expondo financeiramente os motivos pelos quais os agricultores tendem a preferir investir em commodities com finalidade energética às alimentícias.

	CANA*	FELJÃO*
Investimento inicial	R\$2.750/ha**	R\$2.160/ha**
Despesa por safra	R\$820/ha	R\$1.600/ha
Frete (500km)	R\$60/ton	R\$66/ton
Retorno	1 ano	3 1/2 anos
Seqüestro anual de carbono	1,6 ton/ha	1,3 ton/ha
* Lavoura sem irrigação ** ha = hectare		
Fontes: Estância São Pedro, Fazenda Lagoa Bonita, IBGE, Camil, João Carlos Sá/UEPG, Telmo Amado/UFSM, Cimélio Bayer/UFRGS e Humberto Zomer		

Figura 7. Produção de commodities para mercado alimentício *versus* energético. Fonte: Tiraboschi (2009).

O pessimismo do cenário é corroborado por estudos que demonstram que plantas oleaginosas e gramíneas possuem rendimento fotossintético insatisfatório (Chisti 2007; Rittmann 2008). Estima-se que a porcentagem de luz que é de fato fixada em energia química (eficiência fotossintética) em plantas oleaginosas seja próxima de 1% e em gramíneas, 8% (Moore, 1995).

Conclui-se que o sucesso do emprego de biomassa para fins energéticos tem como condição determinante o aumento de produtividade que pode ser alcançado por dois meios: aperfeiçoamento das tecnologias de produção; ou desenvolvimento científico e tecnológico visando à inserção quase total da biomassa na cadeia de produção, o chamado biocombustível de segunda geração.

2.2. Biocombustíveis de 2ª geração

Apesar de as próprias usinas de álcool e biodiesel aproveitarem a biomassa residual em processos de combustão, faz-se necessário investir em tecnologias que possibilitem um direcionamento mais nobre para essa biomassa.

Considerando o peso seco da cana-de-açúcar como exemplo, apenas 14% é formado por açúcares (Carroll e Somerville 2009), enquanto cerca de 45% é composto por celulose, hemicelulose e lignina: polímeros complexos de glicose componentes da parede celular (Andrade et al., 2004). A ideia de disponibilizar a glicose estocada nesses polímeros, através de processos químicos enzimáticos, originou a tecnologia de segunda geração possibilitando um destino mais inteligente à biomassa residual com a inserção da mesma na cadeia de produção de combustível.

A estimativa é de que o aproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar eleve a produção de álcool em 30 a 40% para uma mesma área plantada (Pacheco 2011). As demais matérias-primas para as quais se buscam tecnologias de processamento, tais como capim-elefante, braquiárias, panicuns e árvores de crescimento rápido podem representar alternativas competitivas e eficientes para locais onde não se cultiva cana-de-açúcar ou outras commodities.

Atualmente não há tecnologia comerciável para a produção da glicose de celulose, porém os esforços em pesquisa e desenvolvimento são crescentes e acredita-se que em pouco tempo essa tecnologia vai estar disponível. A combinação das rotas de primeira e segunda geração permitirá obter maior quantidade de combustível sem aumentar o volume de matéria-prima cultivada nem a área plantada. O desenvolvimento tecnológico do etanol de segunda geração não exclui a tecnologia em uso atualmente nem tampouco limita o surgimento de alternativas mais verdes e avançadas, como é o caso dos biocombustíveis de 3ª geração.

2.3. Biocombustíveis de 3ª geração

Essa alternativa surgiu como parte da solução para o baixo rendimento e alto requerimento de terras férteis e água que seus antecessores apresentam. A tecnologia envolve o cultivo de microorganismos

fotossintetizantes, como **microalgas** e cianobactérias, visando à produção de diversos tipos de cadeias carbônicas (Tredici e Materassi, 1992; Herzog e Drake, 1996). Há estudos envolvendo o uso de biomassa de microalgas para a obtenção de etanol, porém a estratégia mais promissora prevê o emprego desses organismos na cadeia de produção de biodiesel já que algumas espécies são capazes de produzir e estocar naturalmente altas quantidades de óleo (Griffiths e Harrison, 2009).

A produção do biodiesel de algas é similar ao que acontece com as sementes de plantas oleaginosas; após a prensagem e extração dos lipídeos é feita uma reação de transesterificação com esse óleo, obtendo-se o produto final. A torta residual pode ser aproveitada na própria usina, através de combustão, ou comercializada visto que a biomassa de microalgas possui compostos de alto valor agregado.

O cultivo pode ser feito em água salobra, marinha ou doce, em áreas desérticas ou áridas, onde a incidência luminosa é alta. A Figura 8 auxilia a visualização de uma “fazenda” de microalgas em sistema aberto.

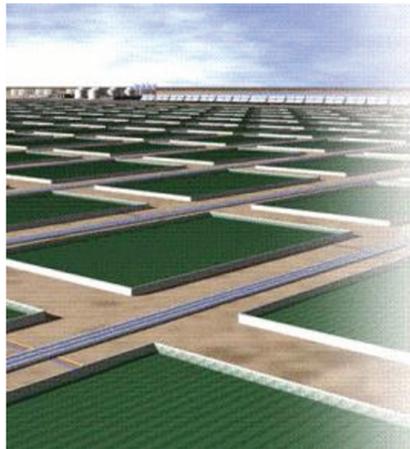


Figura 8. Exemplo de “fazenda de microalgas” com sistema aberto. Os tanques são conhecidos como *raceway ponds*, possuem profundidade reduzida para permitir a penetração máxima de luz. Créditos: Alegnol.

Assim como os de 2ª geração, ainda não há tecnologia suficiente para a implantação dessa vertente em escala comercial. Os empecilhos estão na escolha de espécies robustas e produtivas e nos altos custos de implantação da infraestrutura. Porém, apesar dos percalços, especialistas afirmam que a idéia é promissora e factível em médio prazo, necessitando de investimentos maciços em pesquisa e desenvolvimento na fase atual.

CAPÍTULO II

MICROALGAS COMO FONTE DE ENERGIA

1. MICROALGAS: ASPECTOS GERAIS

1.1. Vantagens sobre plantas superiores para produção de biocombustíveis

1.2. Como superar as barreiras de produtividade

2. ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO: FRACIONAMENTO EM TRÊ ETAPAS

2.1. Estratégias para aumentar o acúmulo lipídico

3. ESCOLHA DA ESPÉCIE: NEOCHLORIS OLEOABUNDANS

1. MICROALGAS: ASPECTOS GERAIS

O grupo Algas compreende vários táxons de organismos aquáticos e fotoautotróficos agrupados principalmente no Reino *Plantae*. A maior parte das espécies é unicelular e mesmo as pluricelulares mais complexas não possuem raízes, caules ou folhas verdadeiras. Todas as espécies são eucarióticas, possuindo núcleo verdadeiro envolto por carioteca. Embora tenham sido consideradas plantas durante muito tempo, apenas as algas verdes (*Chlorophyta*) têm uma relação evolutiva estreita com vegetais superiores.

As algas podem ser divididas didaticamente em dois grandes grupos: microalgas e macroalgas. As microalgas são unicelulares e frequentemente confundidas com cianobactérias. Apesar de fotossintetizantes, cianobactérias não possuem núcleo verdadeiro (são procariotas) sendo classificadas no Reino *Eubacteria*, como as bactérias. Acredita-se que as microalgas surgiram a partir da simbiose entre um eucarioto primitivo e uma cianobactéria (Figura 9). Segundo essa hipótese, uma vez dentro da célula, a cianobactéria teria evoluído a cloroplasto ao longo do tempo, perdendo genes e tornando-se dependente do controle nuclear do hospedeiro eucariótico. As primeiras microalgas datam de 1,5 bilhões de anos e acredita-se que esses microorganismos são a principal matéria orgânica formadora de petróleo e gás natural, juntamente com o zooplâncton (Ball 2005).

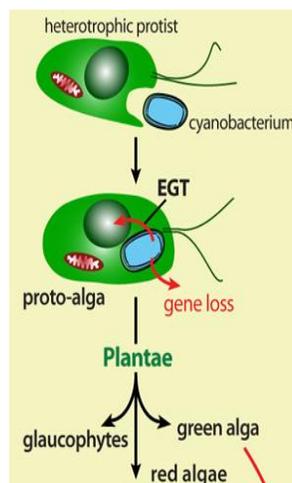


Figura 9. Teoria da endossimbiose. Um eucarioto primitivo teria internalizado uma cianobactéria, originando um ancestral comum a algas e plantas. Adaptado de Chan (2010).

Existem vários grupos taxonômicos de microalgas, sendo as principais: diatomáceas, algas verdes e dinoflageladas. Estes grupos são os maiores componentes do fitoplâncton, formando a base das cadeias alimentares aquáticas, e respondem por 50% do oxigênio presente na atmosfera (Field et al., 1998).

Estima-se que a produção de uma tonelada de biomassa de algas proporcione a remoção de 1,83 toneladas de CO₂ através de processos fotossintéticos (Chisti 2007). Assim a proposta de utilizá-las para produção de biocombustíveis, em paralelo com a mitigação do CO₂, surgiu como uma alternativa bastante plausível (Herzog e Drake, 1996), sendo considerada sucessora do etanol celulósico ainda em desenvolvimento (Andrich et al., 2005; Ratledge e Cohen, 2008).

Por se tratar de um grupo de extrema biodiversidade, há organismos capazes de produzir vários compostos de interesse econômico como pigmentos, vitaminas, açúcares e óleos (Borowitzka, 1995; Pruvost et al., 2002). Algumas espécies são utilizadas para nutrição humana e indústria cosmética; outras têm parede celular silicosa, ideais para a indústria de tintas e filtros. Essa grande biodiversidade e consequente variabilidade na composição bioquímica da biomassa, aliadas ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em larga escala, vêm permitindo a utilização comercial de algumas espécies (Derner et al., 2006).

Vários tipos de combustíveis renováveis podem ser obtidos a partir de microalgas (Figura 10): metano, através de fermentação da biomassa (Spolaore et al., 2006); bio-hidrogênio, diretamente do processo de fotossíntese (Kapdan e Kargi 2006); biodiesel a partir do óleo extraído (Sawayama et al., 1995; Sheehan, 1998; Gavrilesco e Chisti 2005) e etanol a partir de carboidratos (Stephens et al., 2010).

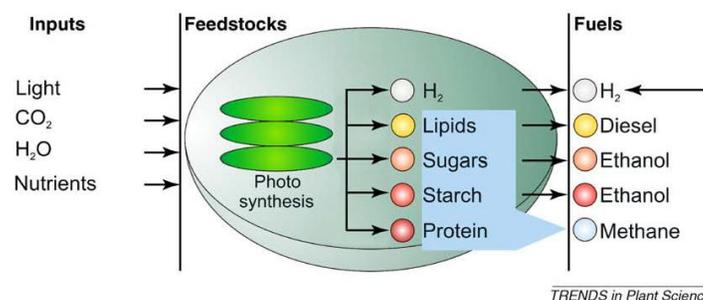


Figura 10. Produção de biocombustíveis de 3ª geração a partir de microalgas. Os compostos produzidos a partir de luz, CO₂, água e nutrientes podem ser explorados pelas diversas frentes do mercado energético Fonte: Stephens e colaboradores (2010).

Os óleos produzidos são matérias-primas propícias para a produção de diesel, suas características físico-químicas são similares às de óleos vegetais (Teixeira 2007a), dispensando a substituição da infraestrutura existente em motores e sistemas de abastecimento (Briggs 2004). Enquanto sementes oleaginosas, como a soja, contêm cerca de 18% de lipídeos em peso seco, algumas espécies de microalgas chegam a ter valores próximos a 80%, favorecendo seu emprego para fins energéticos (Metzger e Largeau 2005; Hu et al., 2008).

1.1. Vantagens das microalgas sobre plantas superiores para produção de biocombustíveis

Como fonte renovável de energia, a microalga é vantajosa por combinar fotossíntese mais eficiente devido à estrutura celular simplificada (Rittmann, 2008); o alto rendimento, característico do cultivo controlado de microorganismos (Rosenberg et al., 2008) e elevadas taxas de crescimento (Araújo et al., 2009). Tal rendimento é corroborado pelo fato de existirem espécies cujo conteúdo lipídico atinge 80% da biomassa seca e pela estimativa de que possam produzir de 20.000 à 30.000 vezes mais óleo que a maioria das oleaginosas numa mesma área (Teixeira 2007a) devido à alta eficiência fotossintética e de fixação de carbono (Ratledge e Cohen 2008). Especialistas estimam que para a completa substituição do petrodiesel destinado ao transporte nos EUA pelo biodiesel a partir de microalgas seria requerida de 2% a 6% da área classificada como cultivável dos EUA; enquanto para o cultivo de palma, 48% da área fértil seria necessária para suprir essa demanda (Chisti 2007).

As vantagens estendem-se ainda ao processo de cultivo, pois a cultura não compete por solos viáveis para a agricultura podendo ser mantida em qualquer tipo de área, inclusive em regiões áridas e desérticas que desfrutam de iluminação abundante boa parte do ano. Os cultivos em sistema fechado podem estender-se verticalmente, diminuindo ainda mais a necessidade de área (Tredici e Materassi, 1992). Os gastos com água são menores, visto que o líquido é utilizado apenas como suporte das culturas e pode ser reciclado, tão logo a biomassa é aproveitada (Sheehan, 1998); há ainda espécies capazes de crescer em água salobra, rejeitos e água marinha. Ao fator sustentabilidade, adiciona-se a fácil

manipulação por serem unicelulares, de estrutura simples e ciclo de vida relativamente curto (Hallmann, 2007).

1.2. Como superar as barreiras de produtividade

Apesar de tecnicamente exequível, a produção de biodiesel a partir de microalgas precisa ter os custos drasticamente reduzidos. Além das reduções da receita destinada a infraestrutura, duas outras estratégias principais podem ser adotadas: o aproveitamento completo da biomassa de algas; e a aplicação de técnicas de melhoramento genético, visando aumentar a produtividade em óleo e biomassa.

A diversificação de produtos tem o potencial de proteger a produção contra as flutuações do valor do óleo e subsidiar seu preço, sugerindo que a coprodução é necessária em curto prazo (Stephens et al., 2010). Pigmentos e outros compostos de alto valor agregado podem ser aproveitados, a biomassa residual pode ser direcionada para a indústria alimentícia, tanto na produção de suplementos alimentares com a fração protéica (Ugwu et al., 2008), quanto na produção de ração animal (Ratledge e Cohen, 2008). Também pode ser produzido etanol e metano via fermentação da biomassa ou tecnologia de segunda geração (Ratledge e Cohen, 2008).

Além do aproveitamento inteligente da biomassa, a manipulação genética dos organismos se faz necessária, não só no sentido de aumentar a produtividade lipídica, mas também a robustez e as taxas de crescimento da maioria das espécies (Roessler et al., 1994), pois espécies de rápido crescimento geralmente apresentam baixos teores lipídicos, diminuindo o rendimento final (Tran et al., 2009).

2. ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO: FRACIONAMENTO EM TRÊS ETAPAS

Sabe-se que em microalgas a duplicação celular e o acúmulo lipídico são metabolicamente divergentes. Enquanto no primeiro caso as cadeias carbônicas são desviadas para a síntese protéica, no segundo o objetivo é o armazenamento dessas cadeias (Rodolfi et al., 2009). Na tentativa de solucionar

esse impasse dividiu-se o processo de cultivo em três etapas subsequentes (Figura 11): (1) a primeira etapa dedicada ao aumento da quantidade de células na cultura por divisão celular, (2) a segunda consistindo na acumulação efetiva de lipídeos e (3) a terceira finalizaria o processo com a secreção espontânea dos lipídios.

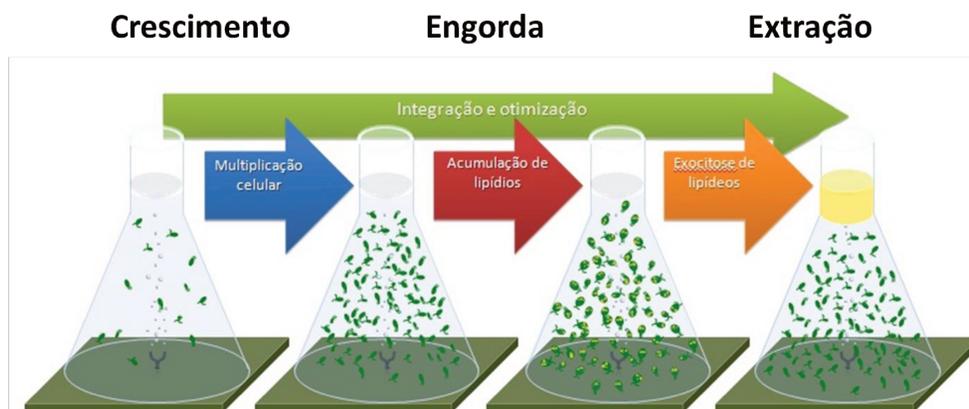


Figura 11: Representação do modelo de produção de cadeias carbônicas lipídicas em três etapas. Figura gentilmente cedida por Isabella Toni (LGE UNICAMP, Campinas-SP).

A situação mais próxima da ideal seria aquela em que as células primeiramente se multiplicassem com alta velocidade, seguido de outro período no qual a quantidade de células não sofreria alteração. Nesta segunda etapa seria fornecida uma sinalização capaz de induzir o acúmulo lipídico e, conseqüentemente, aumento do volume celular. Ao final dessa etapa, ocorreria a secreção dos lipídeos para o meio extracelular, facilitando a recuperação dos mesmos e evitando a perda das células. Um modelo semelhante foi anteriormente proposto por Walker e colaboradores (2005) para a produção de ω -3, exceto pela etapa de excreção. O processo de Walker (2005), assim como o nosso, consiste em uma etapa prévia de acumulação de biomassa e uma etapa subsequente onde ocorre o aumento de massa devido à acumulação do composto de interesse, mostrando que o processo é factível.

O sucesso do modelo proporcionará o desenvolvimento de uma plataforma de produção de cadeias carbônicas lipídicas que servirá de base para aplicação em escala industrial. Adicionalmente, os dados gerados em cada etapa deverão nortear a estratégia de manipulação genética de forma a unir em uma única espécie a capacidade de se multiplicar rapidamente e acumular lipídeos no momento desejado. O projeto

aqui descrito insere-se na segunda etapa, visando aumentar os teores lipídicos da espécie estudada e entender as bases moleculares desse acúmulo.

2.1. Estratégias para aumentar o acúmulo lipídico

As microalgas possuem processo fotossintético e de biossíntese de lipídios similares ao descrito para plantas superiores (Guschina e Harwood 2006), assim estas podem nos servir de ponto de partida. Em plantas superiores o metabolismo de lipídios está bem caracterizado e há estudos descrevendo a manipulação dessas vias tanto no sentido de modificar o perfil de ácidos graxos (Broun e Somerville 2001), quanto aumentar a produção destes (Jaworski e Cahoon 2003). Em ambos os organismos, o ciclo de Calvin é o ponto inicial para o metabolismo de carbono, como mostra a Figura 12.

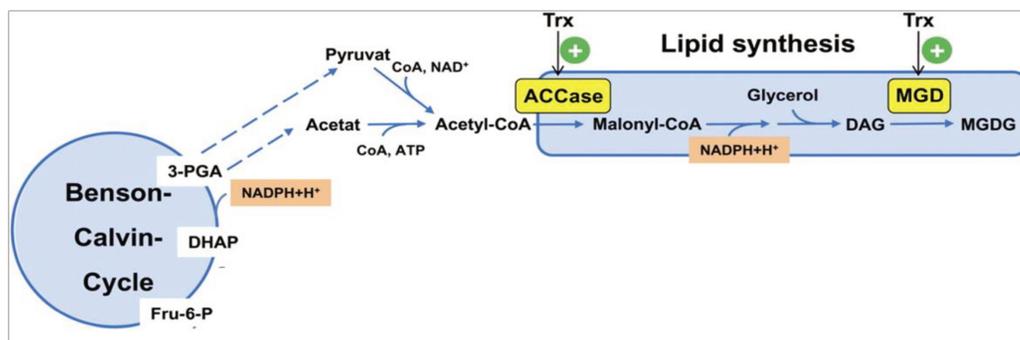


Figura 12. Síntese de lipídeos no cloroplasto de plantas e algas (Dietz e Pfannschmidt, 2011).

Há diversos estudos sobre a manipulação das condições de cultivo de microalgas com o objetivo de aumentar a produtividade lipídica. A privação de nutrientes, como nitrogênio e a manipulação de variáveis, como o pH, têm mostrado bons resultados (Sheehan, 1998). Em diatomáceas o aumento da atividade da enzima ACCase (enzima chave da biossíntese de ácidos graxos) foi correlacionado à falta de silício no meio de cultura (Sheehan, 1998), assim como a falta de nitrogênio em algas verdes pode influenciar positivamente o teor lipídico (Sheehan, 1998). Aumentos de até 70% foram reportados recentemente para diversas espécies em resposta à limitação de nitrogênio, dentre os lipídeos totais, TAGs saturados e monoinsaturados respondem por 80% do total (Borowitzka, 1988; Roessler, 1990; Hu 2007).

Acredita-se que as algas respondam dessa forma como estratégia de sobrevivência, pois a falta de um nutriente essencial sinaliza estresse ambiental. Frente a isso, os organismos remodelam seu metabolismo de forma a poupar as cadeias carbônicas, parando o crescimento e estocando o carbono recém assimilado para reforçar as reservas energéticas (Rodolfi et al., 2009). Dessa forma, boa produtividade lipídica e altas taxas de crescimento parecem ser dois fatores mutuamente excludentes, uma vez que para a “engorda” o cultivo deve ser feito em privação de nutrientes, condição desfavorável à multiplicação celular. Por isso, a integração das diferentes etapas propostas pelo grupo se faz essencial.

3. ESCOLHA DA ESPÉCIE: *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS*

Neochloris oleoabundans é uma microalga verde, unicelular, pertencente à classe *Chlorophyceae*, mesmo táxon da espécie modelo *Chlamydomonas reinhardtii*. Apesar de pouco estudada, é bastante citada devido a seu teor lipídico alto e foi escolhida com base em revisões bibliográficas que comprovam essa superioridade (Tornabene TG, 1983; Sheehan, 1998; Li et al., 2008; da Silva et al., 2009; Griffiths e Harrison 2009; Pruvost et al. 2009; Beal et al., 2010; Huang et al., 2010; Wahal e Viamajala, 2010; Murray et al., 2011; Pruvost et al., 2011; Wang e Lan, 2011).

Para fins comparativos, plantas oleaginosas possuem eficiência fotossintética de aproximadamente 1% (Larkum, 1981; Moore, 1995) e o teor lipídico das sementes em torno de 18% (Teixeira, 2007a). Para *N. oleoabundans* não há relatos de dados específicos de eficiência fotossintética, porém sua porcentagem lipídica gira em torno de 35 a 54% (Teixeira, 2007a), podendo apresentar valores próximos a 80% em condições de cultivo específicas (Carvalho, 2005). Além de sua capacidade natural de acumular lipídios, a espécie cresce em água doce e possui um perfil de ácidos graxos ideal para a conversão a biodiesel, como TAG com poucas insaturações e cadeias médias (Tornabene TG, 1983).

A prospecção por espécies classificadas como promissoras, porém pouco conhecidas, assim como *N. oleoabundans*, pode apontar espécies de futura aplicação industrial. Recentemente, uma extensa revisão

analisou e comparou dados de produtividade publicados referentes a 55 microalgas (Griffiths e Harrison, 2009). Os autores colocam a *N. oleoabundans* em um patamar elevado de produtividade lipídica, sendo considerada uma das três melhores espécies para fins energéticos.

CAPÍTULO III

DESCRIÇÃO DO PROJETO, MATERIAL E MÉTODOS

1. O PROJETO

1.1. Objetivos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico e cultivo

2.2. Avaliação do crescimento

2.3. Experimento de privação de nutrientes

2.4. Fluorimetria

2.5. Isolamento de DNA e RNA

2.6. Sequenciamento de DNA

2.7. Montagem do genoma e predição gênica

2.8. Construção dos iniciadores

2.9. Síntese de cDNA e Real-time PCR

2.10. Cromatografia

1. O PROJETO

A necessidade do desenvolvimento de alternativas energéticas renováveis, limpas e de baixo custo é a principal motivação para o desenvolvimento do projeto. A proposta inicial era bastante ampla, visando a caracterização geral e genética da espécie *Neochloris oleoabundans*, além de propor a definição de um estresse ambiental capaz de induzir o acúmulo lipídico. Ao dar início às atividades de bancada observamos que a espécie levava muito tempo para crescer, comprometendo a execução do projeto em tempo hábil. Através dos primeiros experimentos e do próprio amadurecimento de idéias, um caminho diferente foi traçado deixando o projeto mais focado e menos amplo. Experimentos preliminares mostraram que a manipulação do nitrogênio poderia causar mudanças no acúmulo lipídico e dessa forma, nos posicionamos a investigar as bases moleculares do acúmulo nessa situação; além das análises genômicas e caracterização do crescimento.

1.1. Objetivos

Geral

Avaliar os efeitos que a privação de nitrogênio pode causar em *Neochloris oleoabundans* com enfoque no acúmulo lipídico.

Específicos

- Caracterização geral da espécie quanto ao crescimento.
- Prova do conceito de que a privação de nitrogênio induz o acúmulo lipídico.
- Cultivo em meio completo, seguido de privação de nitrogênio e posterior avaliação de expressão gênica.
- Acompanhamento dos teores lipídicos em condições controle e em privação de nitrogênio.
- Sequenciamento e análise do genoma da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico e cultivo

A espécie *Neochloris oleoabundans* foi adquirida através da coleção de microalgas da Universidade do Texas (UTEX). A mesma está contida no Reino *Plantae*, Divisão *Chlorophyta*, Classe *Chlorophyceae*, Ordem *Chlorococcales*, Família *Chloococcaceae*.

A partir da literatura e de testes preliminares definimos os parâmetros que utilizamos durante o projeto: meio de crescimento Bold's Basal Medium (Tabela1) (Nichols e Bold, 1965), temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 3$ (Wang e Lan, 2011), regime integral de luz a 50 ou 100 μmol de fótons/ m^2s^{-1} (Wahal e Viamajala 2010), agitação de 100 rpm ± 10 (Iyovo GD 2010), pH 7,5 (Pruvost et al., 2009) e ausência de injeção de ar. Todos os parâmetros estão dentro das faixas recomendadas (Sorgeloos, 1996). Os cultivos eram mantidos em erlenmeyers de volumes variados e os inóculos eram feitos a partir de meio sólido ou líquido, neste caso usávamos de 0,5 a 10% v/v de pré inóculo.

Tabela 1. Composição do meio Bold's Basal Medium (Nichols e Bold, 1965).

Componente	Concentração
NaNO ₃	2,9mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3mM
NaCl	0,4mM
KH ₂ PO ₄	1,3mM
K ₂ HPO ₄	0,4mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,17mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30,7uM
MnCl ₂ .4H ₂ O	7,3uM
MoO ₃	4,9uM
CuSO ₄ .5H ₂ O	6,3uM
CoNO ₂ .6H ₂ O	1,7uM
H ₃ BO ₃	0,18mM
EDTA	0,17mM
KOH	0,18mM
FeSO ₄ .7H ₂ O	17,9mM
Ácido Cítrico	10mM

2.2. Avaliação do crescimento

Para a avaliação das taxas de crescimento escolhemos o método que utiliza densidade ótica (D.O. ou turbidez) ou contagem de células. Fizemos as medições de turbidez ao comprimento de onda de 750

nm (Sager, 1953; Siripornadulsil et al., 2002; Rodolfi et al., 2009) em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000) uma vez ao dia ou a cada dois dias em média.

A avaliação da turbidez de uma cultura de microorganismos constitui um método confiável de estimar a concentração celular, embora indireto. Um feixe de luz direcionado à suspensão celular é parcialmente desviado pelas células e a porcentagem de luz não desviada é medida pelo equipamento. A quantidade de luz que atravessa a suspensão depende da concentração de células, do tamanho destas, do comprimento de onda, da intensidade da luz incidente e do diâmetro da cubeta utilizada. Estes últimos valores são todos fixos, de forma que temos como variáveis apenas os parâmetros celulares. Os valores de absorbância são plotados em razão do tempo, permitindo a construção de curvas de crescimento. Existe, dentro de certos limites, uma relação linear entre a absorbância da cultura e o número total de células por volume, contudo, para suspensões celulares muito densas é frequentemente necessário diluir as alíquotas.

Além de medições de absorbância, fizemos contagem de células em câmara de Neubauer (Lobban, 1988). A câmara é uma lâmina espessa de vidro, de uso microscópico, com formato retangular e uma depressão no centro. É utilizada para fazer contagem de células por unidade de volume de uma suspensão. No centro da lâmina há várias linhas perpendiculares com marcações em quadrantes (Figura 13). Os quadrantes menores têm volume definido e são considerados para as contagens, possibilitando determinar a concentração de células em um dado volume de cultura (células/ μ L). A Figura 13 ilustra como é feita a contagem.

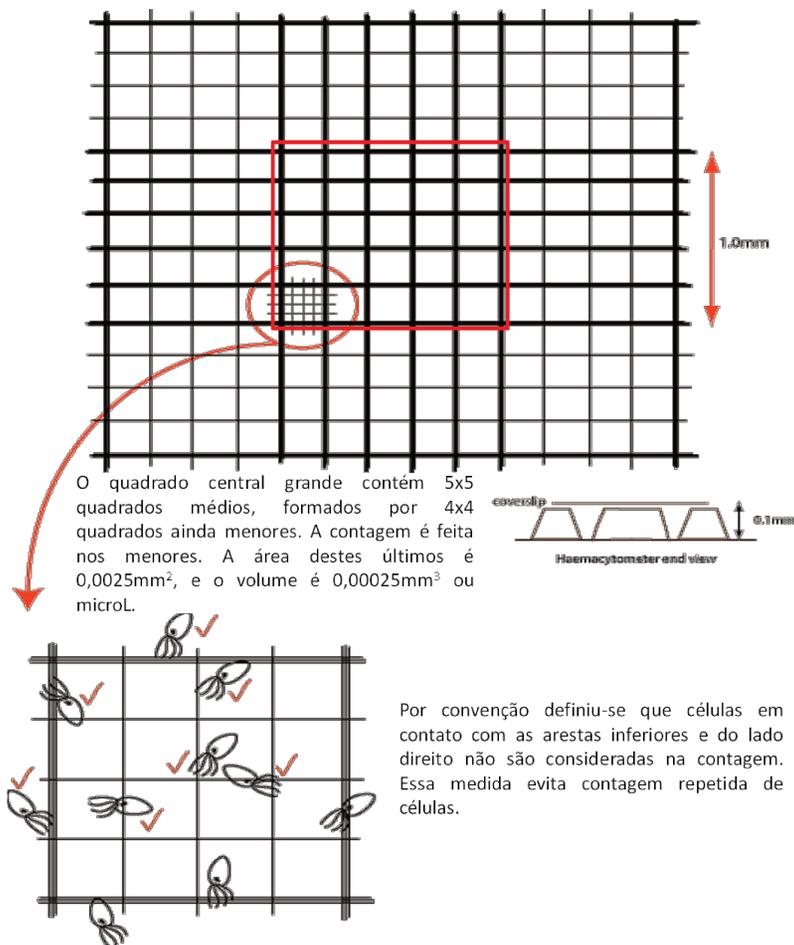


Figura 13. Esquema de contagem de células em câmara de Neubauer. Adaptado de Lobban (1988).

2.3. Experimentos de privação de nutrientes

Para a realização dos experimentos, inoculamos as amostras em erlenmeyers de dois litros, contendo 500mL de meio BBM completo, incubamos até a cultura atingir a fase exponencial (aproximadamente 30 dias, para *N. oleoabundans*) então, coletamos a biomassa por centrifugação a 2.000g por 30 minutos e a dividimos em três frações. Em seguida, um terço da biomassa foi transferido para meio de cultivo sem nitrogênio e/ou fósforo, enquanto outro terço foi mantido no mesmo meio e a última parte foi transferida para meio novo, igual ao original (Figura 14). O acúmulo lipídico em todas as situações foi acompanhado através de fluorimetria.

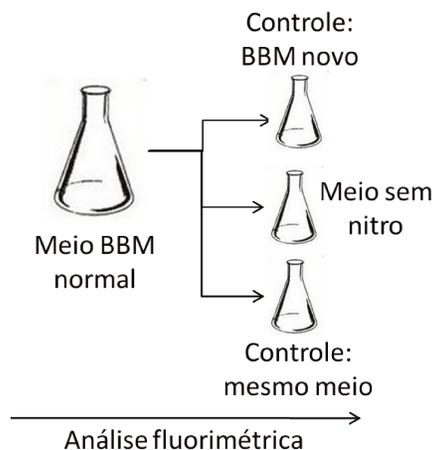


Figura 14. Estratégia experimental para transferência de meio de cultivo.

2.4. Fluorimetria

Para a determinação indireta e relativa do teor lipídico utilizamos fluorimetria. Essa metodologia é indicada para determinação quantitativa de substâncias nas quais ocorre o fenômeno da fluorescência que, segundo Mendham e colaboradores (2002) é resultado da absorção de energia radiante e da posterior emissão de parte dessa energia. A fluorimetria tem como vantagens a elevada sensibilidade e maior seletividade, já que nem todas as substâncias que absorvem radiação eletromagnética são capazes de emitir fluorescência (Gil 2009). Trata-se de uma metodologia amplamente aceita; aplicada em química, medicina, monitoramento ambiental, fisiologia vegetal e mais recentemente, lipídeos intracelulares.

No nosso caso, alíquotas dos cultivos a serem analisados eram tratadas com o corante Nile Red, conhecido por corar lipídios apolares. Ajustamos no equipamento o comprimento de onda que provoca a excitação da corante e o espectro de ondas a ser lido pelo sensor. O fluoróforo Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) é lipofílico e altamente fluorescente em ambiente apolar, utilizado também em microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Essa molécula entra nas células e difunde-se nas gotículas de lipídeos; quanto maior a quantidade de lipídeos apolares dentro da célula, maior a emissão de fluorescência por ele em 580nm, aproximadamente (Chen et al., 2009).

Para a realização dos experimentos, a primeira etapa consiste em incubar uma pequena alíquota do cultivo com 20% v/v de DMSO (dimetil sulfóxido) por pelo menos 12 horas, no caso de *N. oleoabundans*.

Essa etapa é necessária, pois o DMSO age como carreador do corante, facilitando a entrada do mesmo na célula (Chen et al., 2009). Após a incubação, faz-se a contagem das células com o auxílio da câmara de Neubauer e incuba-se por 10 minutos o equivalente a 6.10^6 células em 1,5ml de meio de cultivo com 5 μ L de Nile Red diluído em acetona (0,1mg/ml). As amostras incubadas são então colocadas em cubetas de quartzo e as leituras são feitas. É de suma importância que não haja variação na quantidade de células em cada medição para que os dados possam ser comparativos. O comprimento de onda utilizado para a excitação do corante nos experimentos iniciais foi 488nm, após diversos testes observou-se melhor resposta do mesmo para excitação em 515nm. Em ambiente apolar, o Nile Red emite ondas com comprimento próximo a 580nm e a quantidade de fluorescência emitida é então captada e quantificada em unidades arbitrárias de fluorescência, tornando possível a comparação entre duas amostras.

As análises iniciais foram feitas com o auxílio da professora Eneida do Laboratório de Biomembranas (Departamento de Bioquímica do IB) que nos cedeu o uso do equipamento HITACHI F4500. Nas etapas finais, o equipamento Shimadzu RF 5301(*Shimadzu Scientific Instruments, Inc.*, EUA) foi adquirido e as análises finalizadas com ele. A Figura 15 mostra o exemplo de uma curva típica gerada pelo fluorímetro. Os dados brutos são normalizados em Excel e Origin (OriginLab, Northampton, MA) e a curva é plotada com Unidades Arbitrárias de Fluorescência (UAF) no eixo y e comprimentos de onda no eixo x. A fim de facilitar a comparação dos resultados, fazemos o cálculo da área do pico compreendido entre 540nm e 640nm, indicador da presença de lipídeos, conforme ilustra a Figura 15. Dessa forma, temos valores que podem ser comparados, facilitando a visualização dos resultados dos tratamentos.

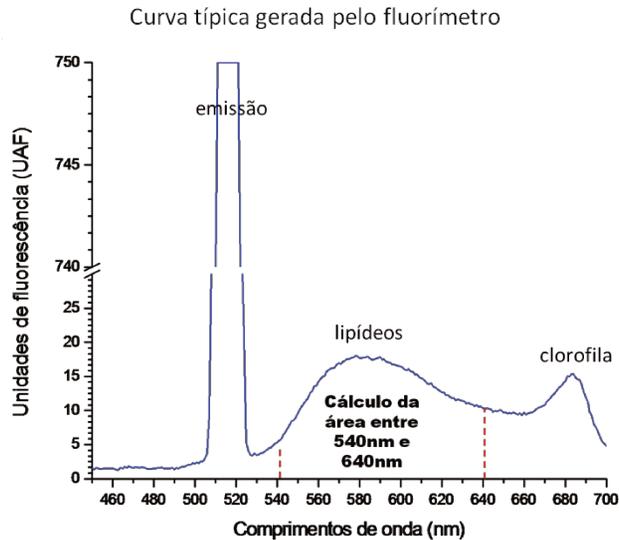


Figura 15. Curva típica gerada por fluorimetria. Em vermelho, destaque para a área utilizada para os cálculos.

2.5. Isolamento de DNA e RNA

Células em crescimento exponencial ou estacionário foram coletadas por centrifugação a 2.000g durante 30 minutos e congeladas em nitrogênio líquido, podendo ser utilizadas imediatamente ou mantidas em biofreezer a -80°C. O rompimento da parede e membrana celular foi feito por maceração da biomassa congelada em cadinho e pistilo de porcelana. O protocolo de isolamento do DNA e RNA foi realizado conforme descrito por Mageschi (2008). Após a maceração das células, adicionou-se 750µL de tampão SDS-EB (2% SDS, 400 mM NaCl, 40 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl ph=8) com 75µL de acetato de sódio 3M ph 5. A essa solução foi adicionado 750µL de fenol:clorofórmio (1:1), seguido de agitação em vórtex e centrifugação por 5 minutos a 12.000g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a etapa de adição de fenol:clorofórmio foi repetida duas vezes. Em seguida, adicionou-se clorofórmio, agitou-se em vórtex e então centrifugamos as amostras por 5 minutos a 12.000g. Recuperamos a fase aquosa, adicionamos volume equivalente de cloreto de lítio 8M e incubamos a 4°C por 4 horas. Centrifugamos a 13.000g a 4°C, lavamos o pellet com etanol 70%, secamos o mesmo e ressuspendemos em água tratada com DEPC (livre de RNAses). Antes da utilização do RNA para síntese de cDNA, tratamos as amostras com DNase.

O protocolo de extração de DNA é muito similar ao de RNA, porém há tratamento com RNase, não com DNase, e a precipitação é feita com etanol 100%, não cloreto de lítio. Após isolamento, a quantificação dos ácidos nucleicos foi feita em NanoDrop 2000c e a qualidade foi aferida em gel de agarose (0,7% p/v).

2.6. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado através da plataforma Solexa™ (Illumina, EUA) (Bennett 2004). A “Duke University” nos EUA viabilizou o acesso e a utilização dos equipamentos de seqüenciamento de DNA e RNA da “High Troughput Sequencing Core Facility” da Universidade da Carolina do Norte, em Chapel Hill, que utiliza equipamentos Illumina/Solexa de última geração. O protocolo de preparo das amostras foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Illumina, EUA).

Essa tecnologia apresenta maior eficiência devido ao uso da chamada clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, permitindo que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez. O sequenciamento é realizado por síntese através da DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. O DNA da amostra é quebrado em fragmentos e estes são ligados aos adaptadores em ambas as extremidades, o que permite sua fixação ao suporte de sequenciamento por hibridização a outro adaptador pré-fixado. Ciclos de amplificação são repetidos por 35 vezes e, após a incorporação de cada nucleotídeo marcado no fragmento em síntese, é feita a leitura do sinal de fluorescência. Por fim, a junção dessas leituras gera os dados de sequenciamento.

2.7. Montagem do genoma e predição gênica

O genoma de *Neochloris oleoabundans*, sequenciado utilizando a tecnologia Illumina/Solexa (Bennett 2004), gerou uma calha de seqüências do tipo *paired-ends* com 2 x 75 pb e tamanho do inserto de 400 pb, e uma calha de seqüências do tipo *mate-pair* com 2 x 50 pb e tamanho do inserto de ~3500 pb. A montagem foi realizada pela equipe de bioinformática do LGE. As seqüências *paired-end* foram montadas

isoladamente. Os *contigs* obtidos foram em seguida, montados em conjunto com as seqüências *mate-pair*, com o objetivo de formar *scaffolds*. Foi utilizando o aplicativo Velvet (Zerbino e Birney 2008) versão 1.0.04. Uma primeira versão de modelos de genes foi obtida com o auxílio do *software* Augustus (Stanke, Diekhans et al., 2008) versão 2.3.1, utilizando o pré-treinamento com a espécie *Chlamydomonas reinhardtii*. Foram identificados apenas 4.896 genes nos *contigs* classificados como de algas, número muito distante do encontrado na espécie relacionada, *Chlorella variabilis* (9.994 genes), por isso o *software* deverá ser treinado com genes de *Chlorella variabilis* disponíveis para gerar uma segunda versão de modelos de genes, mais confiável.

2.8. Construção dos iniciadores

Os primers, ou iniciadores, são pequenas sequências (de aproximadamente 20 pares de bases) complementares ao DNA molde e específicas para o gene a partir do qual ele foi construído. Podem ter a função de auxiliar a amplificação de genes inteiros ou apenas identificá-los dentre um *pool* gênico maior, como é feito no Real-time PCR. Foram desenhados *primers* adequados à realização de Real-time PCR para os genes escolhidos. Os pares de primers para esse tipo de PCR devem amplificar fragmentos entre 95 e 105 pares de bases, devem possuir porcentagem de guanina e citosina (%CG) similares entre si e não podem formar estruturas secundárias, como *hairpins*, dímeros e *loops*. O desenho foi feito com o auxílio do software on-line “Primer 3” (Skaletsky 2000) e a qualidade dos mesmos foi aferida através do programa “Gene Runner” (Hastings Software, Inc.). A especificidade foi analisada através da ferramenta de alinhamento Blastn (Basic Local Alignment Search Tool <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>) contra o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information – banco de dados público de sequências de organismos) e contra o próprio genoma de *N. oleoabundans*, para evitar ampliações inespecíficas.

2.9. Síntese de cDNA e Real-time PCR

A análise da expressão dos genes escolhidos foi realizada através de experimentos de Real-time PCR. Para tanto, a microalga foi cultivada em meio BBM normal até a fase exponencial e em seguida a biomassa foi centrifugada e recuperada. Um terço dessa biomassa continuou crescendo no mesmo meio, outro terço foi transferido para meio BBM sem nitrogênio e a porção final foi transferida para meio BBM normal, conforme descrito no tópico 2.3. Incubaram-se as amostras nessas condições por cinco dias, quando as células foram coletadas e congeladas a -80°C até o RNA ser extraído.

O RNA total extraído foi tratado com RQ1 RNase-free DNase (Promega), quantificado no NanodropTM 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) e em seguida utilizado para a síntese de cDNA. Tal síntese foi realizada através de $1\mu\text{g}$ de RNA e a enzima transcriptase reversa SuperscriptTM II (Invitrogen) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A partir do cDNA sintetizado, foram realizados os experimentos de Real-time PCR, de forma a quantificar a expressão relativa dos genes estudados. A quantificação da expressão foi realizada detectando a fluorescência do reagente SYBRGreen (Applied Biosystems), utilizando a plataforma Step One Plus (Applied Biosystems). O programa de amplificação utilizado consistia em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C , 20 segundos a 55°C e 60 segundos a 60°C . Após cada ciclo de extensão, o aparelho media a fluorescência da amostra. Terminada a amplificação dos fragmentos, foi iniciada a etapa para a formação da curva de *melting*, composto por um ciclo a 95°C por 15 segundos, seguido por uma rampa entre 60°C e 95°C , com leituras do nível de fluorescência a cada aumento de $0,3^{\circ}\text{C}$.

A análise dos dados foi realizada segundo o método proposto por Pfaffl e colaboradores (2001). A partir desses dados, foram calculados os valores de expressão relativa dos genes em todas as condições. O cultivo mantido no mesmo meio ou transferido para meio novo foi escolhido como condição normalizadora do experimento; o gene codificante para actina foi utilizado como normalizador da expressão, visto que sua expressão se mantém relativamente constante nas condições analisadas.

2.10. Cromatografia

As análises de perfil de ácidos graxos em cromatógrafo gasoso foram feitas em parceria com o Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Utilizou-se protocolo padrão empregado com frequência pelo laboratório. Os perfis dos ácidos graxos foram avaliados na forma de ésteres metílicos (EMAG) e a fase orgânica obtida foi analisada por cromatografia gasosa usando uma coluna capilar DB-WAX (J&W, Agilent) e hélio como gás carreador.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO: CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

1. PANORAMA

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Aspectos gerais e observações acerca do crescimento de *Neochloris oleoabundans*

2.2. Curva padrão de *Neochloris oleoabundans*

2.3. Curva de crescimento típica de *Neochloris oleoabundans*

2.4. Curva de crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii*

2.5. Cultivo contínuo *versus* cultivo alimentado

2.6. Experimento preliminar: *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de NaNO_3

2.7. Tempos de geração de *Neochloris oleoabundans* ao longo do tempo

2.8. *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de NaNO_3

3. CONCLUSÕES

1. PANORAMA

Nesta fase dos experimentos, o objetivo era caracterizar o crescimento da espécie e realizar alguns diferentes tratamentos. Trabalhamos também com *Chlamydomonas reinhardtii* para fins comparativos, uma vez que se trata da espécie modelo. O meio de cultivo utilizado para *Neochloris oleoabundans* foi o BBM e o meio TAP (Gorman, 1965) para *Chlamydomonas reinhardtii*. As curvas de crescimento foram feitas a partir da medição da absorbância em 750nm, foi adotada também a metodologia de contagem de células através da câmara de Neubauer.

A partir das fórmulas descritas na Tabela 2, obtiveram-se as taxas de crescimento e tempo de geração para os cultivos. O tempo de geração representa o intervalo necessário para a duplicação de uma célula ou população, sendo também conhecido como tempo de duplicação. Para os cálculos, os valores escolhidos (N1 e N2) devem estar compreendidos necessariamente na fase exponencial (*log*) da curva e devem conter a reta que mais se aproxima da porção linear. Quanto menor esse valor, maior é a velocidade de crescimento da cultura na fase exponencial. A comparação de valores de tempo de geração é bastante aceita, podendo ser adotada para identificar espécies superiores em multiplicação celular (Griffiths e Harrison 2009).

Tabela 2. Fórmulas para obtenção de taxas de crescimento, divisões por dia e tempo de geração. Fonte: CSIRO Microalgae Research Centre (Jameson 2005).

Fórmula	Especificações
$K = \frac{\ln(N2/N1)}{(t2-t1)}$	k: taxa de crescimento N2 e N1: medidas em absorbância ou número de células t2-t1: intervalo de tempo (dias) correspondente ao período entre N2 e N1
$D = K / \ln 2$	D: divisões por dia k: taxa de crescimento
$G = 1/D$	G: tempo de geração, dias que uma célula mãe leva para gerar duas células filhas D: divisões por dia

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Aspectos gerais e observações acerca do crescimento de *Neochloris oleoabundans*

A espécie foi comprada do banco de microalgas da Universidade do Texas (UTEX), sendo recebida em meio sólido e conservada em refrigeração (4°C). Os primeiros inóculos em meio líquido foram feitos a partir da retirada de uma pequena amostra de células do cultivo sólido, através de leve raspagem. Os inóculos posteriores eram replicados a partir de meio líquido, evitando a manipulação recorrente do inóculo original, uma vez que não possuíamos protocolo efetivo para criopreservação da espécie.

Os primeiros contatos com *Neochloris oleoabundans* nos revelaram crescimento lento em todos os meios autotróficos testados. As curvas estendiam-se por mais de 50 dias e a fase *lag* (fase inicial, ou fase de indução) era bastante longa, principalmente quando o inóculo era feito a partir de meio sólido. A literatura descreve essa fase como o período necessário para a célula se adequar ao novo ambiente, identificar os metabólitos presentes no meio e então produzir as enzimas necessárias (Zwietering et al., 1990; Black, 1996), sendo normal que uma população apresente crescimento mais lento, principalmente quando o inóculo é muito jovem ou velho.

Todos os cultivos foram feitos em erlenmeyers de volumes variados e mantidos em shaker iluminado. A agitação é importante, uma vez que o meio de cultura não tem carbono orgânico e não possuímos mecanismo de injeção de gases nos erlenmeyers. O carbono fixado pela microalga encontra-se naturalmente dissolvido na água a partir do CO₂ atmosférico, com o auxílio da agitação. Ao decorrer do projeto adquirimos um fotobiorreator (Labfors Lux, InforsHT) com capacidade para 1,5L de cultura, porém a metodologia para o cultivo de *N. oleoabundans* neste equipamento ainda está sendo padronizada, devido aos finos ajustes que o aparelho permite fazer.

Testamos também variações do meio BBM através da adição de diferentes fontes de carbono orgânico, conforme sugerido por Andersen (2005). Em todos esses testes os cultivos rapidamente mostravam-se turvos, tipicamente contaminados com bactérias, sendo que às vezes a alga nem mesmo

chegava a se desenvolver. O mesmo ocorria tanto em meio líquido quanto em meio sólido, ambos enriquecidos. Acreditamos que, mesmo em autotrofia, as bactérias contaminantes estejam presentes nos cultivos, porém de forma latente e em número controlado devido à falta de carbono orgânico (Levine et al., 2011). É importante salientar que a cultura saudável (ou limpa) apresentava-se verde e límpida, nunca turvada. Sempre que ocorria mudança de coloração para verde amarelado, ou turvação do meio, os cultivos eram descartados. A Figura 16 mostra culturas saudias de *N. oleoabundans*.



Figura 16. Cultivos saudios de *Neochloris oleoabundans* em erlenmeyers de volumes variados. Diferenças de coloração indicam cultivos em idades diferentes.

2.2. Curva padrão de *Neochloris oleoabundans*

A curva padrão realizada corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância e o número de células por unidade de volume, onde é possível verificar a linearidade entre os pontos e então calcular um fator de conversão entre os valores. Para a confecção da curva, foi feita a contagem de células de uma alíquota do cultivo e então, sucessivas diluições da mesma foram submetidas à medição de turbidez a 750nm.

A Figura 17 confirma a relação linear entre número de células e a turbidez do meio; a equação da reta mostrada no gráfico apresenta um valor de R^2 adequado. Esse Coeficiente de Determinação de Pearson (R^2) mede o grau de relação entre os pontos analisados. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 ou -1 indica uma relação linear perfeita; quanto mais próximo da unidade, mais forte é a linearidade entre as variáveis (REF).

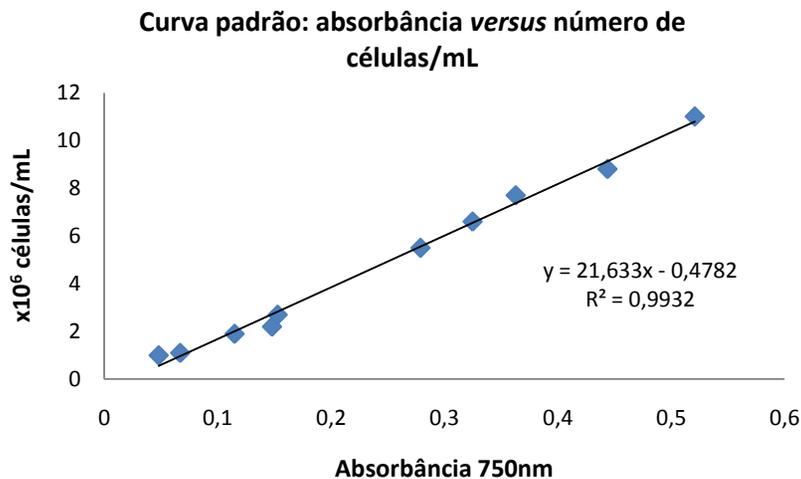


Figura 17. Curva padrão de *Neochloris oleoabundans*. Nota-se a relação linear entre turbidez do meio e quantidade de células para uma mesma amostra. A equação permite fazer a conversão dos valores e o R^2 próximo de 1 confirma a linearidade dos dados.

2.3. Curva de crescimento típica de *Neochloris oleoabundans*

Quando semeada em meio líquido de composição apropriada e incubada em temperatura, agitação e luminosidade adequadas, o seu crescimento segue uma curva definida e característica, típica de microorganismos unicelulares (Figura 18). A quantidade de células na população é representada pela turbidez e a curva é feita relacionando esses valores com unidades de tempo. É relatado na literatura que microalgas possuem dinâmica de crescimento populacional similar ao bacteriano, com pelos menos quatro fases distintas: *lag*, *log*, estacionária e declínio (Fogg, 1966).

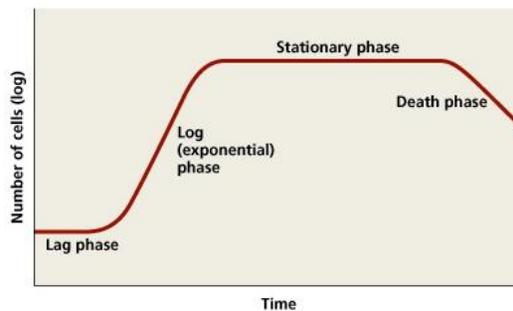


Figura 18. Crescimento populacional típico de microorganismos unicelulares como bactérias, leveduras e microalgas. Observam-se quatro fases características. No eixo x adiciona-se o tempo e no eixo y, o número de células. Copyright © 2006 Pearson Education Inc.

A fase *lag* corresponde ao período de adaptação metabólica das células às novas condições; há intenso metabolismo de síntese, porém praticamente não ocorre divisão celular (Luiz Trabulsi 2008). A

fase *log* é o período onde a população apresenta multiplicação celular máxima e constante. O crescimento ocorre em escala logarítmica e as taxas de duplicação referentes a essa fase dependem das condições de incubação. A fase estacionária inicia-se quando a composição do meio de cultivo já está bastante alterada pelo próprio metabolismo das microalgas e alguns nutrientes já se encontram em depleção, ficando difícil sustentar as taxas de crescimento da etapa anterior. Nessa fase, a quantidade de células que surgem equipara-se às que estão morrendo. Por fim, na fase de declínio já não há divisão celular e o processo de morte da população encontra-se avançado.

A Figura 19 mostra curvas de crescimento típicas de *Neochloris oleoabundans* em termos de absorbância e número de células para um mesmo cultivo. Foram feitas diversas curvas durante o projeto, escolhemos esta por representar melhor o padrão de crescimento inicialmente apresentado pela espécie. Este experimento não conta com réplica biológica, uma vez que no início dos cultivos era extremamente difícil conseguir biomassa satisfatória devido ao longo tempo que a espécie levava para crescer. A cultura foi feita em erlenmeyer de 3L, com volume de 1L de meio e inoculo de 10% v/v, mantida sob agitação de 100 rpm e submetida a regime integral de luz à $50 \mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2/\text{s}^1$.

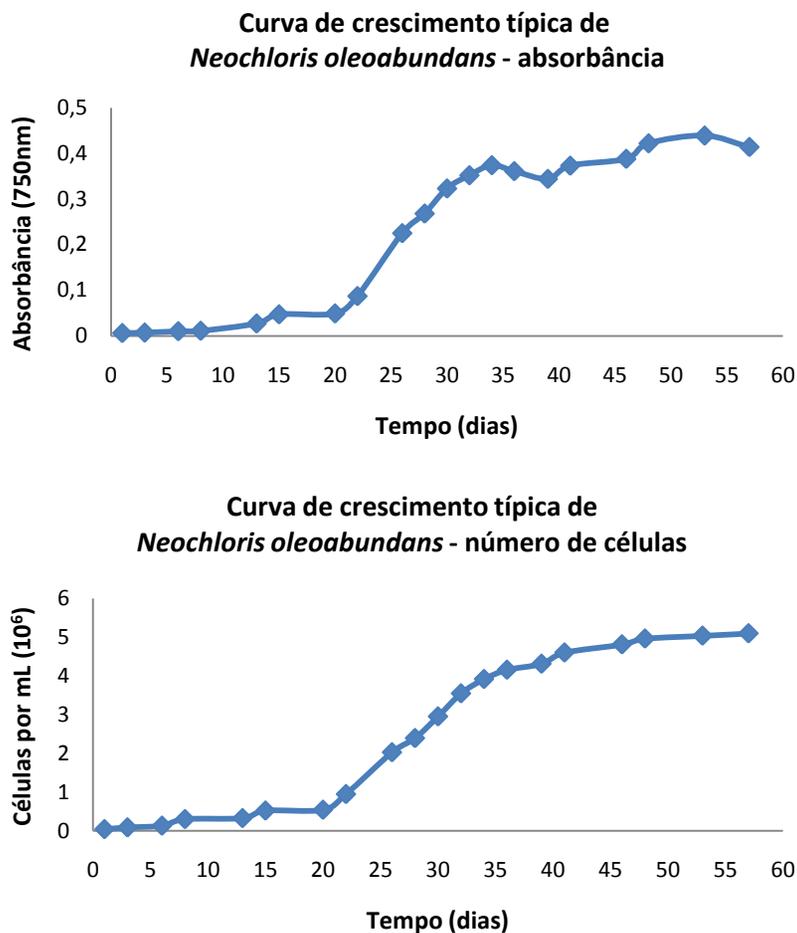


Figura 19. Curvas de crescimento de *Neochloris oleoabundans* em meio BBM. Acima: valores de absorvância. Abaixo: número de células por volume. O tempo de duplicação calculado é de 4 dias.

Percebe-se que a espécie apresenta fase *lag* bastante extensa, levando aproximadamente 20 dias para iniciar a etapa logarítmica. A duração dessa fase é característica de cada espécie, mas também depende diretamente do estado do inóculo inicial (Luiz Trabulsi , 2008). Inóculos feitos a partir de culturas em fase *lag* ou estacionários tendem a se comportar dessa forma. Acreditamos que por isso nossas curvas iniciais apresentaram fase *lag* extensa, os primeiros inóculos eram feitos a partir de culturas jovens ou de meio sólido. A curva foi feita considerando a população total, sem distinção de células viáveis e mortas, por isso não há fase de declínio característica.

De um modo geral, conclui-se que *N. oleoabundans* não é uma espécie de crescimento rápido. A fase exponencial também é longa, o tempo de duplicação calculado é de quatro dias aproximadamente e a turbidez máxima alcançada é inferior ao reportado para outras microalgas similares como *Thalassiosira*

pseudonana, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* (Silvana Ohse, 2008). Adicionalmente, o tempo requerido por *N. oleoabundans* para atingir a fase estacionária é cerca de cinco vezes maior que o reportado para essas outras microalgas (Silvana Ohse, 2008). Acreditamos que a adição de CO₂ às culturas poderia aumentar as velocidades de crescimento e quantidade de biomassa da espécie, assim como visto para *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa*, e *Scenedesmus obliquus* (Gao, 2003; Xia e Gao, 2003).

A grande biodiversidade do táxon Microalgas permite espécies com padrões de crescimento muito divergentes. Apesar de lentas em relação a bactérias e leveduras, que completam seus ciclos em poucas horas (Au et al., 2011), microalgas apresentam taxas de crescimento muito superiores a plantas evolutivamente derivadas (Ratledge e Cohen, 2008). Porém, ainda é necessário que esse tempo seja reduzido, a fim de tornar esses organismos competitivos economicamente; principalmente no caso de *Neochloris oleoabundans* que se apresenta ainda mais lenta que outras microalgas similares.

2.4. Curva de crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii*

A realização desse experimento teve como objetivo permitir a comparação entre *C. reinhardtii* e *N. oleoabundans* em termos de dinâmica de crescimento. Entretanto, a comparação entre as duas espécies deve ser vista com cautela, uma vez que uma não cresce bem no meio de cultivo da outra. O meio de crescimento de *C. reinhardtii* contém adição de fonte de carbono orgânica (acetato), ao contrário do meio de *N. oleoabundans* onde todo o carbono existente é incorporado a partir do CO₂ que naturalmente se dissolve na água. Como são espécies bastante diferentes, os requerimentos nutricionais são muito divergentes, sendo difícil adotar um único meio que possibilite o crescimento de ambas. A Figura 20 mostra a curva de crescimento típica de *C. reinhardtii*, nota-se que a espécie apresenta o mesmo padrão de crescimento que *N. oleoabundans*, em relação às fases, porém com velocidade muito superior.

Mais do que comparar, é importante frisar que o crescimento de microalgas em geral é lento, se comparado a bactérias e leveduras, e até mesmo a espécie considerada modelo apresenta limitações, sendo necessária a adição de carbono orgânico.

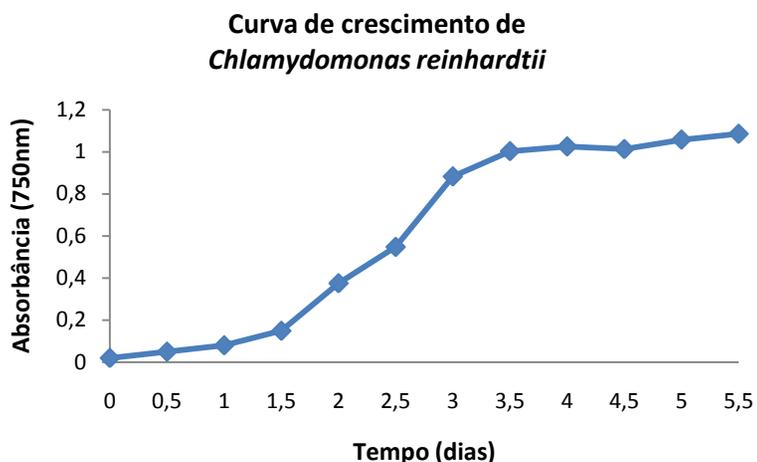


Figura 20. Curva de crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii* em função de valores de absorvância.

2.5. Cultivo contínuo versus cultivo alimentado

A fim de caracterizar o crescimento populacional dessa espécie em meio alimentado e não alimentado (também chamado batelada), foram feitos dois cultivos em erlenmeyers de 3L, com volume de 1mL de meio e inóculo de 10% v/v, mantidas sob agitação de 100 rpm e submetidas a intensidade luminosa de 50uM fótons/m²/s¹.

O cultivo em batelada consiste em um único inóculo de células em meio estéril e posterior incubação da cultura por diversos dias até atingir a densidade celular máxima. Esse tipo de cultivo é utilizado devido a sua simplicidade e flexibilidade, porém a produtividade é menor que no sistema alimentado, pois a população paralisa as divisões celulares mais rapidamente, devido à depleção de nutrientes. O sistema alimentado consiste em adicionar meio de cultivo à cultura na mesma razão em que alíquotas são retiradas. Esse procedimento permite maior produtividade, pois mantém a população em fase estacionária por mais tempo, com taxa de crescimento muito próxima da máxima. É o sistema mais utilizado para produção comercial de microalgas e seus produtos, apesar do alto custo e complexidade (Sorgeloos, 1996).

A Figura 21 mostra as curvas feitas com dados de turbidez a 750nm. Os cultivos foram mantidos durante 57 dias, contando com 22 pontos de coleta. A cada coleta era retirado 10mL de cada cultivo, sendo 1mL para medições de absorvância e o restante para contagem de células e medições de peso seco.

No caso do cultivo alimentado, 10mL de meio novo era adicionado a cada coleta. Apesar dos esforços em obter os valores de peso seco, a biomassa era muito pequena e as balanças utilizadas, mesmo de precisão, não apresentavam reprodutibilidade suficiente para massas tão baixas. Acreditamos que se essas medições tivessem sido feito de forma diferente, através de filtração e não evaporação do meio, a pesagem teria sido possível (Pruvost et al., 2009).

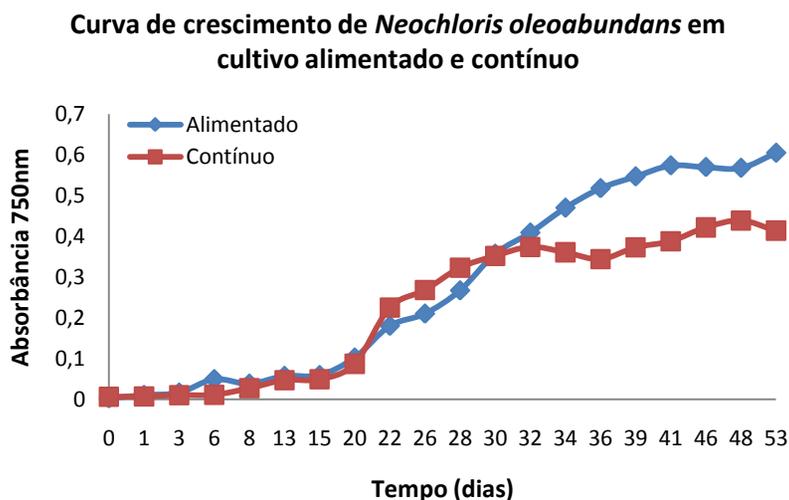


Figura 21. Crescimento de *Neochloris oleoabundans* em cultivo alimentado e cultivo contínuo.

Nota-se que, como reportado na literatura para microalgas e diversos outros organismos, o cultivo mantém-se em fase exponencial por mais tempo quando é alimentado com meio novo (Win et al., 1996). Esse fenômeno ocorre devido ao fornecimento constante de nutrientes, capaz de suportar o metabolismo de divisão celular. Acreditamos que a estabilização do cultivo alimentado por volta do 46º dia, possa ser explicada devido ao pequeno volume de meio que era repostado em relação ao volume total do cultivo. Provavelmente o meio de cultura entrou em depleção, mesmo que tardiamente, estabilizando a população.

2.6. Experimento preliminar: *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de NaNO_3

Nas etapas iniciais do projeto foram feitos testes preliminares com algumas fontes de nitrogênio, como amônia, nitrito, uréia e nitrato. Através de inspeção visual e medições de absorvância, concluímos que a melhor fonte foi o nitrato; inferência posteriormente confirmada em um estudo específico para *N.*

oleoabundans em diferentes fontes de nitrogênio (Li et al., 2008). Assim, todos os experimentos foram feitos com BBM tendo nitrato de sódio (NaNO_3) como fonte de nitrogênio.

Experimentos avaliando a variação da concentração inicial de nitrogênio no meio foram realizados duas vezes durante o mestrado, a primeira delas foi feita ao início dos cultivos (junho de 2009) e contou com duas concentrações de NaNO_3 diferentes: 5mM e 10mM. Os resultados estão apresentados na Figura 22 e mostram que a partir de 20 dias de cultivo a amostra incubada em 5mM de NaNO_3 mostra crescimento mais acelerado que em 10mM.

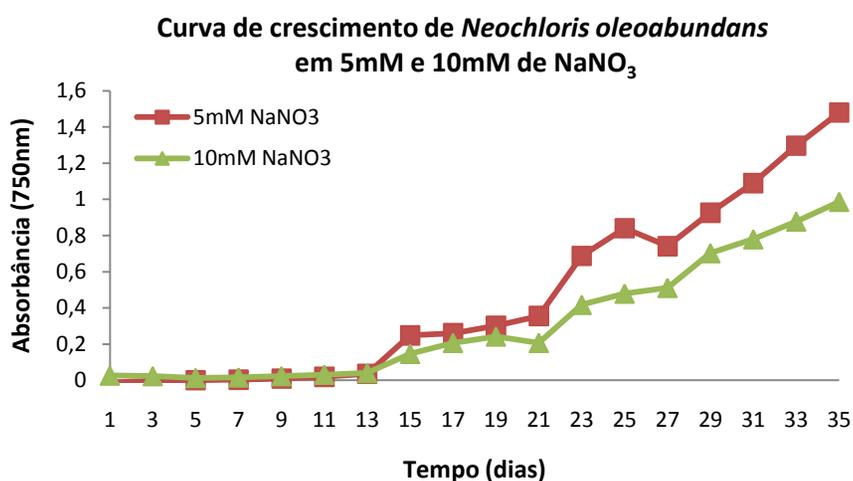


Figura 22. Curvas de crescimento de *Neochloris oleoabundans* em 5 e 10mM de NaNO_3 inicial.

Nessa ocasião, a hipótese que formulamos era a de que talvez 10mM de nitrato esteja acima da concentração ótima para o crescimento dessa espécie. Posteriormente, fizemos experimentos com outras concentrações de NaNO_3 que corroboram essa teoria, eles estão descritos no tópico 2.8 deste capítulo.

Este foi o primeiro teste feito com manejo de nitrogênio e, além do acompanhamento do crescimento, foram realizadas também análises fluorimétricas e cromatográficas a fim de avaliar os efeitos do manejo em termos de quantidade e qualidade de lipídeos produzidos pela alga. As Figuras 23 e 24 mostram esses resultados.

Perfil de ácidos graxos de *Neochloris oleoabundans* em 5 e 10mM de NaNO₃

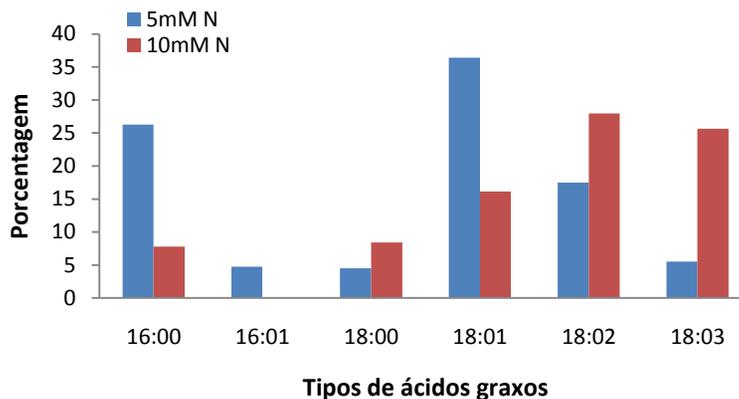


Figura 23. Perfil de ácidos graxos de *Neochloris oleoabundans* cultivada em 5mM e 10mM de NaNO₃. Eixo x: os números referem-se às quantidades de carbono e de insaturações nas cadeias, por exemplo, “18:1” é um ácido graxo de 18 carbonos e 1 insaturação.

Esse experimento mostra a qualidade dos ácidos graxos presentes na célula em porcentagem, nos diferentes tratamentos (5 e 10mM de NaNO₃). Em termos gerais, o efeito do cultivo nas diferentes concentrações de nitrogênio é evidente, nota-se que a porcentagem de cadeias insaturadas é maior na amostra cultivada em 10mM de NaNO₃, enquanto a amostra crescida em 5mM apresenta 18:1 e 16:0 bastante aumentados. Esse experimento teve caráter preliminar e o objetivo do mesmo não era avaliar os tipos de ácidos graxos produzidos em cada situação. O objetivo de apresentá-lo aqui é apenas mostrar que na ocasião observamos que provavelmente há efeito qualitativo do nitrogênio na produção de ácidos graxos. Esse tipo de fenômeno já foi observado para outras espécies, como *Botryococcus braunii* (Zhila et al., 2005), *Chlorella sorokiniana* e *Oocystis polymorpha* (Richardson et al., 1969).

Por outro lado, o efeito dessas duas concentrações de NaNO₃ sobre a quantidade de lipídeos, evidenciado pela fluorimetria (Figura 24), mostra-se pequeno; a diferença dos picos em 580nm não é muito significativa, porém, apesar de inconclusivo, esse resultado não foi ignorado e outra abordagem mais detalhada foi adotada.

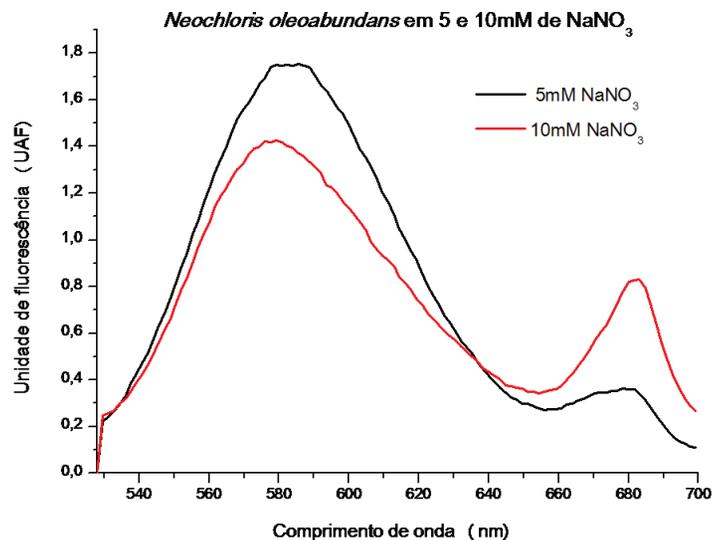


Figura 24. Fluorimetria de *Neochloris oleoabundans* cultivada em 5mM e 10mM de NaNO_3 inicial. O pico em 580nm mostra a presença de lipídeos apolares, enquanto o pico próximo de 700nm corresponde a autofluorescência da clorofila.

Os resultados nos mostraram que as diferentes concentrações iniciais de nitrogênio poderiam estar exercendo efeito qualitativo e talvez quantitativo sobre a produção de ácidos graxos ou lipídeos nessa espécie. Pode-se afirmar que este foi o experimento responsável pelas próximas decisões em relação ao andamento do projeto, direcionando o foco ao manejo de nutrientes.

2.7. Tempos de geração de *Neochloris oleoabundans* ao longo do tempo

Além das curvas de crescimento apresentadas até o momento, foram feitas diversas outras curvas preliminares e todas elas mostraram crescimento parecido com o descrito: lento e com densidade celular máxima mediana. Essas curvas foram feitas no início do projeto de mestrado e, curiosamente, ao final deste período observamos que os cultivos já não demoravam tanto tempo para apresentar coloração e turbidez satisfatória. A fim de visualizar e quantificar esse fenômeno, reunimos todas as curvas feitas desde 2009, sempre com o meio BBM padrão, e calculamos o tempo de duplicação para cada uma delas de acordo com as fórmulas apresentadas na Tabela 2. Os resultados estão apresentados na Figura 25.

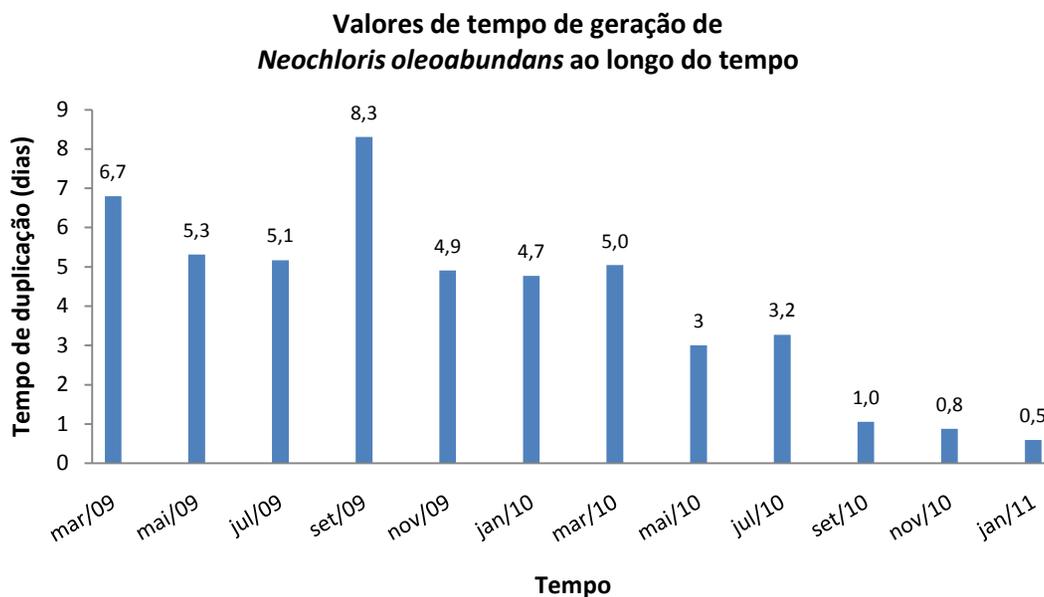


Figura 25. Valores de tempo de duplicação de diversas curvas feitas com *Neochloris oleoabundans*, cultivada em meio BBM padrão, ao longo do período do mestrado.

Para nossa surpresa encontramos valores de tempo de geração cerca de dez vezes menores atualmente (0,5 dia) do que os calculados para as curvas iniciais do projeto (5 dias, em média). A única modificação significativa feita durante esse biênio foi a aquisição de um equipamento shaker em maio de 2010 com iluminação melhor do que a que usávamos anteriormente, aproximadamente o dobro. Porém, mesmo após a aquisição do aparelho, os valores de tempo de geração continuaram apresentando decréscimo, mostrando queda da ordem de seis vezes após essa mudança neste período (maio/2010 a jan/2011). Além da melhora nas condições de iluminação, que parece ter diminuído o tempo de geração em quase duas vezes (curvas de 2009 em relação a maio e julho de 2010), acreditamos que pode ter ocorrido seleção artificial de células mais velozes ao longo do tempo, explicando a continuação da queda nos tempos de geração mesmo após a adoção do novo shaker.

O princípio da seleção artificial baseia-se na premissa de que a variabilidade genética continua sendo gerada em populações em crescimento, enquanto há divisão celular (Lakeman et al., 2007). Os organismos que tenham as características que se deseja transmitir para próximas linhagens são selecionados e propagados por várias gerações. No tipo de seleção não intencional, o mecanismo é o mesmo, porém não há a consciência de que ele está sendo aplicado. Na literatura, há relatos de seleção

artificial para tamanho de células de microalgas verdes (Michod e Roze, 2001), microorganismos para biorremediação (Swenson et al., 2000), bem como seleção de larvas de bivalves de crescimento mais rápido (Taris, Batista et al., 2007).

Essa hipótese é plausível, pois a manutenção das nossas culturas é feita através de replicações periódicas de cultivos líquidos mais maduros assim, uma cultura origina o inóculo de outra. Durante esse processo, células que cresciam primeiro podem ter sido selecionadas para originar novos cultivos e sucessivamente, exatamente como é feita a propagação intencional. Adotamos essa metodologia de manutenção de culturas, pois não há cultivo permanente crio-preservedo dessa espécie no nosso laboratório e preferimos evitar a manipulação recorrente do inóculo original. Observações em microscópio confirmaram que não houve contaminação cruzada de espécies e testes com a amostra original estão sendo iniciados a fim de realizar comparações com os cultivos atuais.

Acreditamos que se a metodologia de seleção e propagação tivesse sido feita de forma proposital talvez os ganhos fossem ainda melhores. *Neochloris oleoabundans* já é naturalmente superior em produtividade lipídica (Griffiths e Harrison, 2009) e tendo sua velocidade de crescimento melhorada, as chances de aplicação industrial dessa espécie aumentam.

2.8. *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de NaNO_3

Este experimento foi feito ao final do período do mestrado quando a espécie já se apresentava mais veloz, por isso as taxas de crescimento e a duração do teste são diferentes do que foi apresentado até o momento.

O objetivo era observar se há diferença em termos de crescimento quando o cultivo é feito em diversas concentrações iniciais de NaNO_3 . Testamos o efeito do nitrogênio, adicionando 2mM, 2,9mM (concentração padrão do BBM) 4,4mM, 5,8mM, 7,3mM, 8,8mM e 11,7mM de NaNO_3 ao meio BBM. Os resultados estão apresentados na Figura 26.

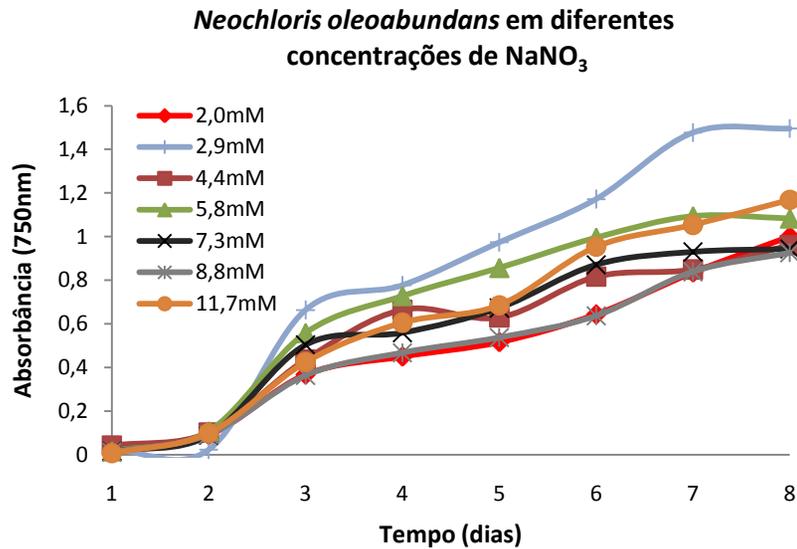


Figura 26. Crescimento de *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações iniciais de NaNO₃.

Nota-se que a concentração que suporta melhor crescimento de *Neochloris oleoabundans* é 2,9mM, concentração padrão do meio BBM, utilizada em todos os outros experimentos. Acreditamos que esse valor seja adequado devido à proporção de fosfato e nitrato balanceada no meio BBM. Segundo especialistas, o crescimento é modulado principalmente pela razão entre esses dois macronutrientes, sendo que o manejo de apenas um deles causa efeitos diferentes do que a manipulação de ambos; é possível que, ao modificar também as concentrações de fosfato, os resultados sejam diferentes (Rowley, 2010).

O meio BBM tem razão N:P próxima de 2:1, sendo considerado o mínimo para suportar crescimento de várias espécies (Levich, 1999). Porém, a necessidade desses nutrientes é muito variável entre os diversos táxons de microalgas, de forma que a proporção N:P ótima deve ser calculada experimentalmente, com base na necessidade celular individual (Levich, 1999). Na literatura não encontramos valores de aporte de nitrogênio e fósforo específicos para *Neochloris*, porém há experimentos testando diversas concentrações de NaNO₃, sem variação de fósforo (Li et al., 2008).

Acreditamos que as necessidades específicas de N:P de *Neochloris oleoabundans* precisam ser determinadas de forma a maximizar a captação e aproveitamento desses nutrientes, evitando fornecimento excessivo ou insuficiente dos mesmos. De acordo com os resultados conseguidos, continuamos utilizando a concentração original do meio BBM: 2,9mM de NaNO₃.

3. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados nesta fase mostraram que a espécie apresentava taxas de crescimento muito baixas no início do projeto, ao contrário do que ocorria ao final. Observamos taxas de duplicação em torno de 10 vezes maiores em relação aos primeiros cultivos (feitos dois anos antes) e seis vezes maiores em relação os primeiros cultivos em iluminação adequada (feitos oito meses antes). Além do efeito da iluminação adequada, acreditamos que pode ter ocorrido seleção artificial não intencional de cepas mais velozes. Adicionalmente, realizamos alguns testes preliminares com manejo de nitrogênio que nos sugeriram que a espécie poderia responder bem a esse procedimento.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

***Neochloris oleoabundans* E O MANEJO DE NUTRIENTES**

1. PANORAMA

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO: MANEJO DE NUTRIENTES

2.1. Fluorimetria – padronização da metodologia

2.2. *Chlamydomonas reinhardtii* e *Neochloris oleoabundans* em privação de nitrogênio

2.3. *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de nitrogênio

2.4. *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de fósforo

2.5. Manejo conjunto de nitrogênio e fósforo

2.6. Compilação de todos os dados de manejo

3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS* EM PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO

3.1. Escolha dos genes e construção dos iniciadores

3.2. Padronização das reações de amplificação e experimento de Real-time PCR

4. CONCLUSÕES

1. PANORAMA

A deficiência de nutrientes tem sido considerada a forma mais eficiente de aumentar o teor lipídico em microalgas (Spoehr e Milner, 1949), entretanto há muita variação nas respostas, principalmente quanto à privação de nitrogênio. Diatomáceas por exemplo, não aumentam seus teores lipídicos em depleção desse nutriente (Shifrin e Chisholm, 1981; Benemann, 1996). Microalgas verdes (*Chlorophyceae*) mostram várias respostas diferentes, desde aumentos consideráveis (como em *C. pyrenoidosa*) até reduções ou ausência de efeito, como em algumas espécies do gênero *Dunaliella* e *Tetraselmis suecica* (Borowitzka, 1988). Até mesmo dentro de um Gênero (por exemplo, *Chlorella*) há espécies que acumulam amido, enquanto outras, lipídeos (Hu, 2007).

Acredita-se que o fenômeno ocorre, pois quando uma cultura é colocada em privação de um nutriente mas é mantida em condições ideais de aeração e iluminação, a fotossíntese continua e o fluxo de carbono fixado é desviado da síntese de proteínas para lipídeos ou carboidratos. A capacidade de sintetizar lipídeos *de novo*, parece ser característica de algumas microalgas oleaginosas que, em estresse, canalizam o fluxo de carbono e energia para síntese de moléculas de reserva, principalmente triacilglicerídeos (TAGs) (Rodolfi et al., 2009). Os TAGs são facilmente armazenados nas células e, quando oxidados, geram mais energia que carboidratos, por isso, são considerados a melhor reserva energética para reconstrução celular após o estresse (Roessler, 1990).

Visamos investigar se *Neochloris oleoabundans* é uma espécie que responde bem à privação de nutrientes e então avaliar a resposta em nível de expressão gênica. Para tal, testamos os efeitos do manejo de fósforo e nitrogênio em termos de acúmulo lipídico. O procedimento experimental foi detalhado no tópico 2.3 do Capítulo III e ilustrado na Figura 14. Para avaliação indireta dos teores lipídicos utilizamos técnicas de fluorimetria, conforme descrito no Capítulo III, tópico 2.4.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO: MANEJO DE NUTRIENTES

2.1. Fluorimetria - padronização da metodologia

A metodologia fluorimétrica foi utilizada para comparar os teores lipídicos de amostras submetidas a diferentes tratamentos. Testes preliminares feitos com *C. reinhardtii* e *N. oleoabundans* (dados não apresentados) mostraram a primeira dificuldade: o corante Nile Red é capaz de entrar nas células da primeira espécie facilmente, enquanto que em *N. oleoabundans* isso não ocorria com a mesma facilidade. Dessa forma, buscamos soluções na literatura e testamos a adição de CTAB ou DMSO às amostras previamente à incubação com o corante. O CTAB é um detergente que interfere na permeabilidade da membrana celular, podendo facilitar a entrada de moléculas nas células; o DMSO é um solvente potente capaz de solubilizar compostos hidro e lipossolúveis, conhecido por ser um ótimo carreador de moléculas maiores, como o Nile Red.

Observamos que para *N. oleoabundans* a adição de DMSO melhorou significativamente as medições fluorimétricas, resultando em picos mais específicos, enquanto para o CTAB o resultado não foi satisfatório. Foram testadas diferentes quantidades e períodos de incubação com DMSO e concluiu-se que o mais eficiente é tratar com 20% v/v over night. Assim, os experimentos foram feitos seguindo esses critérios. Adicionalmente, testaram-se várias quantidades de células e de corante e escolheu-se trabalhar sempre com $6 \cdot 10^6$ células em volume final de 1,5mL e 5 μ L de corante a 0,1mg/mL.

2.2. *Chlamydomonas reinhardtii* e *Neochloris oleoabundans* em privação de nitrogênio

O objetivo desse experimento foi comparar as respostas de *C. reinhardtii* e *N. oleoabundans* à privação de nitrogênio. As espécies foram cultivadas em seus respectivos meios completos até a fase exponencial e então, parte da biomassa foi transferida para meio de cultivo sem nitrogênio, enquanto a outra fração continuou sendo cultivada no mesmo meio como controle.

Acompanhou-se o acúmulo de lipídeos apolares utilizando 488nm para excitação e normalização das curvas fluorimétricas. Foram feitas medições durante três dias consecutivos após a troca de meio de

cultivo, além de aferições anteriores à transferência. Os resultados estão apresentados na Figura 27 e referem-se ao 3º dia após a troca, quando o efeito foi mais visível.

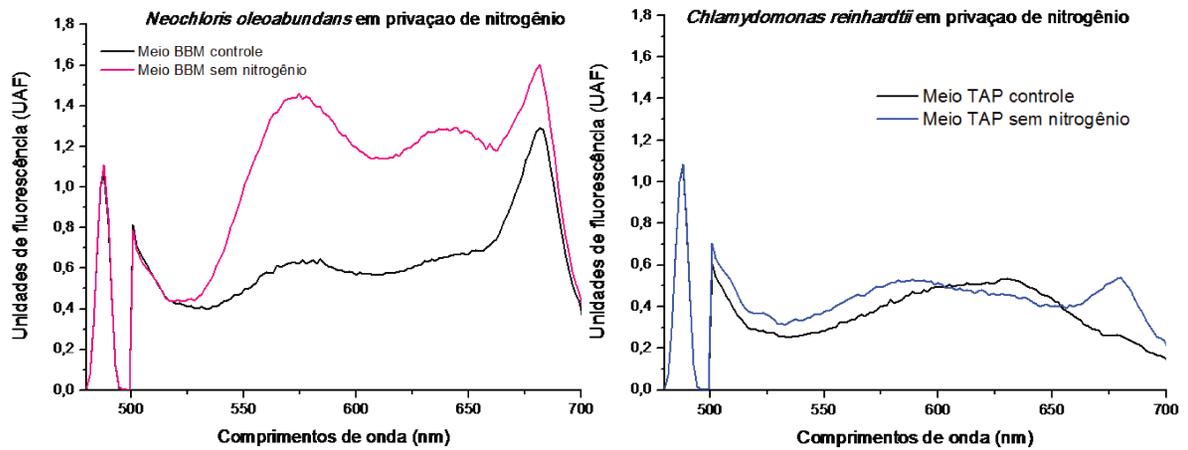


Figura 27. Fluorimetria de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Neochloris oleoabundans* em privação de nitrogênio e no meio controle (mesmo meio). O pico observado em ~488nm refere-se à emissão, por volta de 580nm tem-se o pico correspondente à presença de lipídeos e próximo de 700nm há a autofluorescência da clorofila. Os gráficos estão na mesma escala, permitindo comparação entre as espécies.

Observa-se que para *N. oleoabundans* a amostra privada de nitrogênio apresenta maior emissão de fluorescência em 580nm, indicando maior quantidade de lipídeos apolares nessa amostra em relação ao controle. Por outro lado, *C. reinhardtii* parece não apresentar resposta boa à privação de nitrogênio. O resultado concorda com o esperado, uma vez que essa espécie não é considerada uma espécie oleaginosa, tendo apenas 13% do peso seco em lipídeos (Li et al., 2010). Apesar do caráter preliminar, este experimento direcionou os próximos testes a fim de confirmar o efeito positivo do nitrogênio sobre o acúmulo lipídico em *N. oleoabundans*.

Na literatura há testes de privação de nitrogênio em *C. reinhardtii* e os autores reportam queda na eficiência fotossintética e produção de transportadores de nitrato de maior afinidade (Grossman et al., 2010); porém o estudo é focado na fotossíntese, não apresentando análises acerca do teor lipídico. Há ainda outros estudos feitos com mutantes de *C. reinhardtii* incapazes de produzir amido, estes apresentam teores lipídicos cerca de duas vezes maiores que o tipo selvagem (Wang et al., 2009). Acredita-se que este seria um indício da distribuição das cadeias carbônicas entre a síntese de lipídeos e amido, sendo que o

desligamento desta última via poderia indicar um caminho interessante para intervenção genética, aumentando o fluxo de carbono para a síntese lipídica (Li et al., 2010).

2.3. *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de nitrogênio

Uma vez tendo sido sugerido que a ausência de nitrogênio pode influenciar os teores lipídicos nessa espécie, decidimos testar se a transferência para meios com diferentes concentrações, além da privação, também surtia efeito. Foram utilizadas 100% da quantidade de NaNO_3 presente no BBM para a amostra controle e 50%, 25% e 0% para as demais (2,9mM, 1,5mM, 0,75mM e 0mM, respectivamente). Foram feitos dois controles, um deles era composto por meio BBM novo completo (chamado de amostra “meio novo”) e o outro consistia em continuar cultivando a amostra no mesmo meio BBM do inoculo inicial (“mesmo meio”), já com os nutrientes em possível depleção. O acúmulo lipídico foi acompanhado através de fluorimetria. O fluorímetro foi ajustado a emitir ondas em 515nm e a normalização das curvas foi feita com base nesse pico (o mesmo não está representado nos gráficos). Após a troca dos meios, foram feitas três análises em fluorímetro no 3º, 4º e 5º dias. Os resultados apresentados na Figura 28 são referentes ao 4º dia, pois neste período os efeitos estão mais destacados.

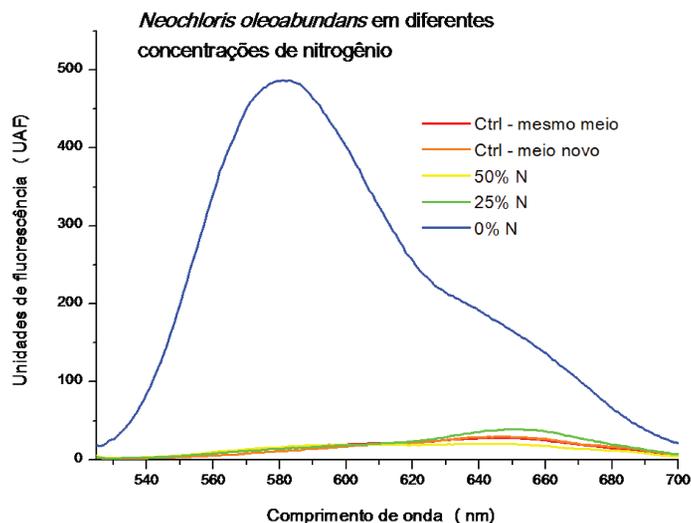


Figura 28. Fluorimetria de *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de NaNO_3 . O pico em 580nm, na situação de privação total de nitrogênio, mostra que a espécie responde bem ao manejo desse nutriente.

Observa-se que a privação total de NaNO_3 é claramente mais eficaz em induzir acúmulo lipídico, enquanto concentrações intermediárias não causam o mesmo efeito. A Figura 29 mostra os mesmos dados em escala menor, com mais detalhes.

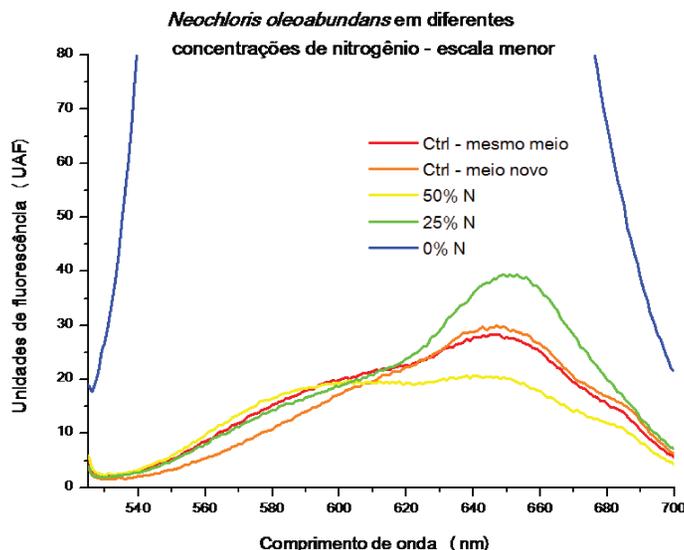


Figura 29. Fluorimetria de *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de NaNO_3 em escala menor. O pico em 660nm corresponde à autofluorescência da clorofila. Nota-se que não houve diferença em 580nm significativa entre as concentrações intermediárias de nitrogênio e os controles.

A partir desse experimento concluímos que a transferência para um meio em completa depleção de NaNO_3 é muito mais eficaz em induzir o acúmulo lipídico do que concentrações intermediárias (50% e 25% do inicial). Notamos também que após o quarto dia de privação o pico de fluorescência em 580nm começa a diminuir, indicando que há um momento ótimo de acúmulo lipídico, após o qual o teor parece começar a decrescer (dados não apresentados).

Recentemente encontramos relatos que corroboram com nossos experimentos. Testes feitos com *Neochloris oleoabundans* em privação total de nitrogênio mostram que a mesma chega a aumentar o teor lipídico para cerca de 60% em peso seco (Gouveia et al., 2009; Pruvost et al., 2011). Apesar de confirmar nossa hipótese, esses experimentos diferem dos nossos em dois aspectos principais: metodologia aplicada e objetivo final.

Quanto à metodologia, observamos que a maioria não foi feita com a troca de meio de cultivo e sim, deixando a cultura atingir a depleção sozinha ou já iniciando o cultivo sem nitrogênio (Gouveia et al.,

2009; Pruvost et al., 2009). Mesmo quando havia a troca de meio, o objetivo não era aplicar o conceito de fracionamento do cultivo visando compensar a perda de rendimento natural da fase de privação. De uma forma geral, todos os experimentos documentados com essa espécie visam principalmente confirmar o potencial industrial da mesma, caracterizar (Gouveia et al., 2009), escalonar a produção de biomassa (Pruvost et al., 2011) e validar novas metodologias de detecção de lipídeos, como ressonância magnética nuclear em estado líquido (Beal et al., 2010), citometria de fluxo (Gouveia et al., 2009) e “microfluidic devices” para prospecção em larga escala (Holcomb et al., 2011).

Além da metodologia, temos outro objetivo final para os experimentos de privação. Visamos analisar o estresse a nível molecular, em termos de expressão gênica, com foco no acúmulo lipídico. No mestrado não houve tempo hábil para a realização de todos os experimentos necessários, mas já temos o gatilho de “engorda” definido e já sabemos como determinar o melhor momento para a coleta das amostras e posterior análise dos transcritos a partir do sequenciamento de RNA. Começamos a analisar a expressão em estresse de alguns genes isoladamente (tópico 3.2 deste Capítulo), porém a meta é verificar a expressão gênica em larga escala.

2.4. *Neochloris oleoabundans* em diferentes concentrações de fósforo

Uma vez verificado o efeito do nitrogênio, decidimos avaliar se a privação de fósforo também seria capaz de causar efeitos similares. O objetivo foi observar se há alteração no teor lipídico de *N. oleoabundans* quando submetida a diferentes concentrações e à privação de fósforo. As fontes de fósforo presentes no meio BBM são: K_2HPO_4 e KH_2PO_4 . Foram utilizadas: 100% da quantidade de ambas as fontes de fosfato presentes no meio BBM, 50%, 25% e 0% correspondendo, respectivamente, a 1,9mM, 0,95mM, 0,475mM e 0m de fosfatos totais. Foram feitos dois controles, um deles composto por meio BBM novo completo (“meio novo”) e o outro consistia em continuar cultivando a amostra no mesmo meio BBM do inoculo inicial (“mesmo meio”), assim como foi feito para o teste com nitrogênio. O fluorímetro foi ajustado para emitir ondas em 515nm e a normalização das curvas foi feita com base nesse pico (não representado nos gráficos). Após a troca dos meios, foram feitas três análises em fluorímetro, no

3º, 4º e 5º dias. Os resultados apresentados (Figura 30) são referentes ao 4º dia, pois notamos que nesse período os efeitos estão mais destacados.

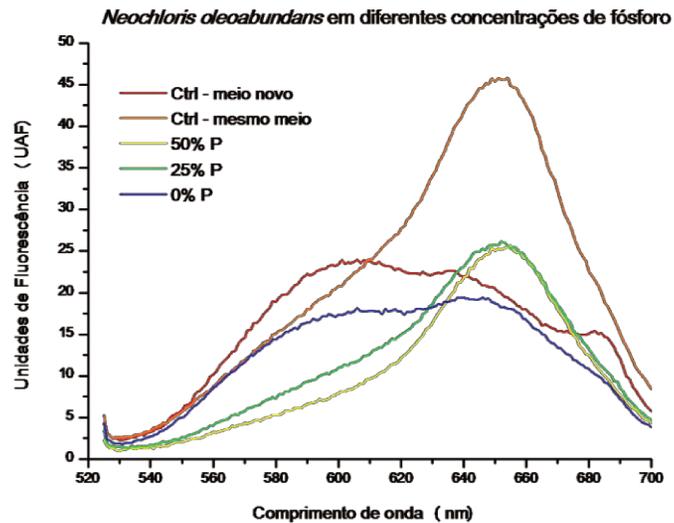


Figura 30. Efeito de diferentes concentrações de fósforo sobre *Neochloris oleoabundans*. Em 580nm há fluorescência referente à presença de lipídeos polares e em 660nm, autofluorescência da clorofila.

Nota-se que a privação de fósforo não causa efeitos consideráveis no teor lipídico das amostras, pois quase não há variação nos picos correspondentes à presença de lipídeos (580nm). As diferenças na autofluorescência da clorofila estão relacionadas à idade da população, sendo maior no cultivo que não sofreu troca de meio.

O fósforo é componente essencial de várias moléculas fundamentais, como DNA, RNA, fosfolipídeos de membrana, ATP e ADP. Tem papel central na transferência de energia, regulação metabólica e sinalização celular (Clarkson, 1995). Na literatura, há relatos de que a privação desse nutriente modifica a composição lipídica de algumas espécies alterando as porcentagens dos diferentes tipos de ácidos graxos, além de aumentar a porcentagem de TAGs em relação ao total de lipídeos (Khozin-Goldberg e Cohen, 2006; Rodolfi, Chini Zittelli et al., 2009). Por outro lado há espécies que respondem de forma completamente diferente, como *Nannochloris atomus* e *Tetraselmis sp.*, apresentando teores lipídicos reduzidos (Xiaodong, 2011). Em termos de genética, a ativação de vários genes já foi reportada em amostras privadas de fósforo, como RNases, fosfatases e transportadores de alta afinidade (Rubio et

al., 2001), porém não foram encontradas evidências moleculares que suportem o aumento do acúmulo lipídico nessa situação, apesar de esse efeito ser observado em algumas espécies

Concluimos que a depleção de fósforo parece não possuir a mesma capacidade que o nitrogênio em sinalizar para a produção de lipídeos em *N. oleoabundans*.

2.5. Manejo conjunto de nitrogênio e fósforo

Uma vez visto o efeito da privação de nitrogênio e fósforo isoladamente, avaliamos se concentrações menores desses nutrientes em conjunto implicariam em maior acúmulo lipídico. Não foi avaliada a privação total de ambos os nutrientes, apenas 50% e 25% da concentração do meio BBM original de cada um. A metodologia experimental foi a mesma adotada para os experimentos anteriores e a Figura 31 compila os dados obtidos com fluorimetria, a partir do mesmo protocolo descrito anteriormente.

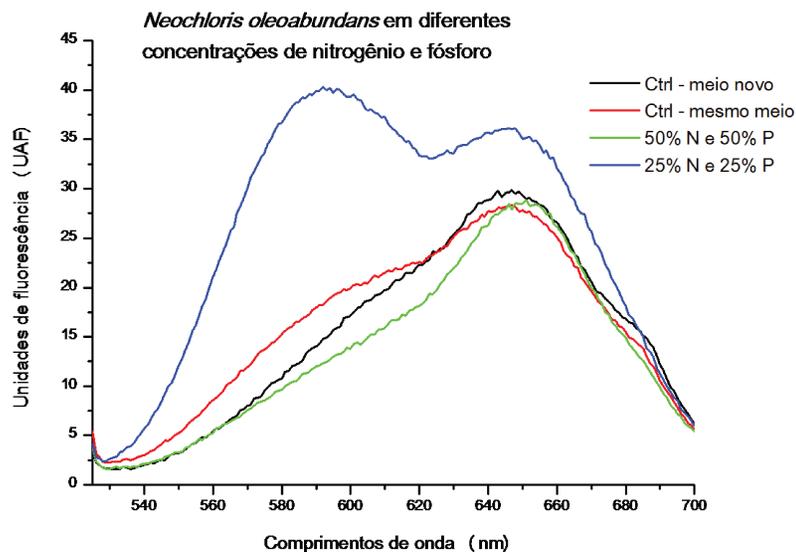


Figura 31. Manejo conjunto de nitrogênio e fósforo e seus efeitos na produção de lipídeos.

Observa-se que a situação que gera melhor resultado em termos de teor lipídico é aquela que combina o menor teor de fósforo e o menor teor de nitrogênio. Entretanto, vê-se claramente que a resposta à privação total de nitrogênio, mostrada no tópico 2.3 deste Capítulo, é muito superior.

2.6. Compilação de todos os dados de manejo

A fim de facilitar a visualização conjunta dos resultados apresentados nos tópicos 2.3, 2.4 e 2.5, calculamos através de integração as áreas dos picos compreendidos entre os comprimentos de onda 540nm e 640nm, correspondentes à presença de lipídeos. Dessa forma obtivemos valores absolutos de área, facilitando a comparação (Figura 32).

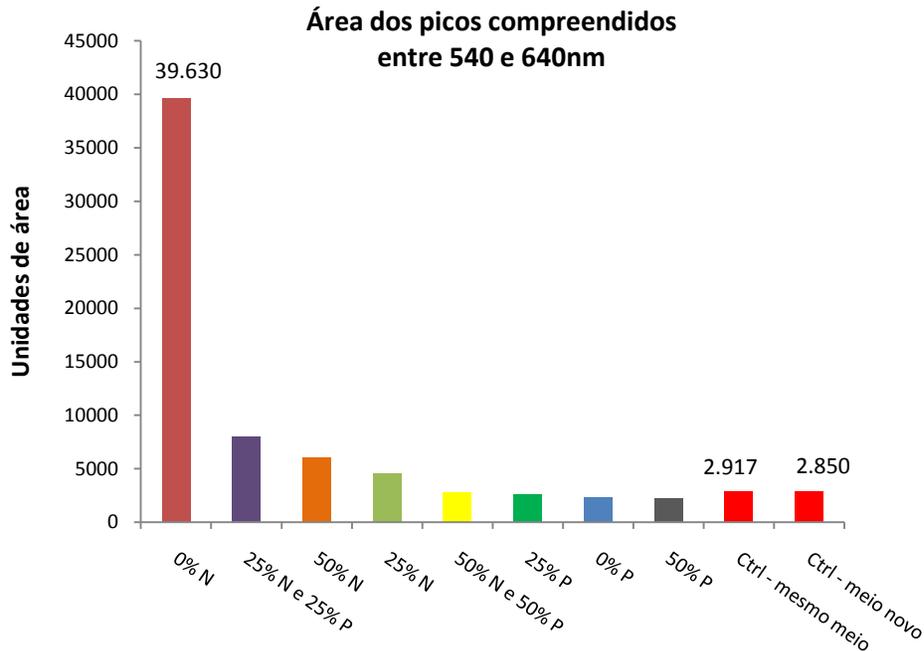


Figura 32. Área dos picos gerados por fluorimetria, compreendidos entre 540nm e 640nm, correspondendo à presença de lipídeos apolares na amostra.

É evidente a resposta de *N. oleoabundans* muito superior à privação total de nitrogênio em relação a todas as outras condições testadas, chegando a apresentar área quase 14 vezes maior que a média das amostras controle.

3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *Neochloris oleoabundans* EM PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO

Como os experimentos de manejo nos mostram que há maior acúmulo de lipídeos em privação total de nitrogênio, decidimos avaliar a expressão de algumas enzimas da via de biossíntese de

ácidos graxos nessa condição. Entretanto, o objetivo final é analisar em larga escala a expressão gênica em privação, porém as dificuldades iniciais, naturais à implantação de uma linha de pesquisa nova, fizeram com que os experimentos finais fossem adiados. Neste primeiro momento, definimos alguns genes pontuais para terem sua expressão avaliada, partindo da premissa que a via de biossíntese de ácidos graxos provavelmente estaria com a expressão da maioria de seus genes aumentada em privação de nitrogênio.

3.1. Escolha dos genes e construção dos iniciadores

A Figura 33 apresenta uma visão simplificada da via de biossíntese de ácidos graxos, destacando as enzimas de interesse, investigadas quanto à expressão gênica. A principal reserva lipídica de microalgas são os triacilglicerídeos (TAGs); armazenados nas gotículas lipídicas intracelulares, eles são formados por ácidos graxos e glicerol e respondem por 80% de todos os lipídeos da célula. Acreditamos que a resposta ao nitrogênio que vimos com a fluorimetria deve corresponder ao acúmulo destes compostos.

A síntese de ácidos graxos em algas e plantas ocorre dentro dos cloroplastos e pode ser dividida em duas principais fases: iniciação e alongação. Na fase inicial ocorre o comprometimento de substratos, na fase de alongação há adição cíclica de moléculas de dois carbonos ao esqueleto em formação. Dois complexos enzimáticos são responsáveis pela síntese: Acetil-CoA carboxilase (ACCase) e Sintase de Ácidos Graxos (FAS ou KAS). O sistema ACCase é responsável pela iniciação da via, sintetizando malonil-CoA a partir de acetil-CoA. As enzimas do complexo FAS catalisam o crescimento do esqueleto carbônico, adicionando blocos de dois carbonos sucessivamente. Essa alongação é feita pelas enzimas 3-Ketoacyl-ACP sintase (KAS), as quais são representadas por 3 isoenzimas: KASI, KASII e KASIII. A KASIII atua no início da via, tendo acetil-CoA e malonil-ACP como substratos. A KASI tem preferência por substratos acil-ACP, alongando a cadeia até palmitoil-ACP (16:0-ACP) e a KASII tem afinidade alta por palmitoil-ACP, alongando o mesmo até estearoil-ACP (18:0-ACP). Normalmente a cadeia é alongada até 16 ou 18 carbonos, sendo então clivada por tioesterases (TE) que liberam ácidos graxos livres e a porção acil-ACP. Escolhemos enzimas representantes do sistema FAS, conforme mostra a Figura 33.

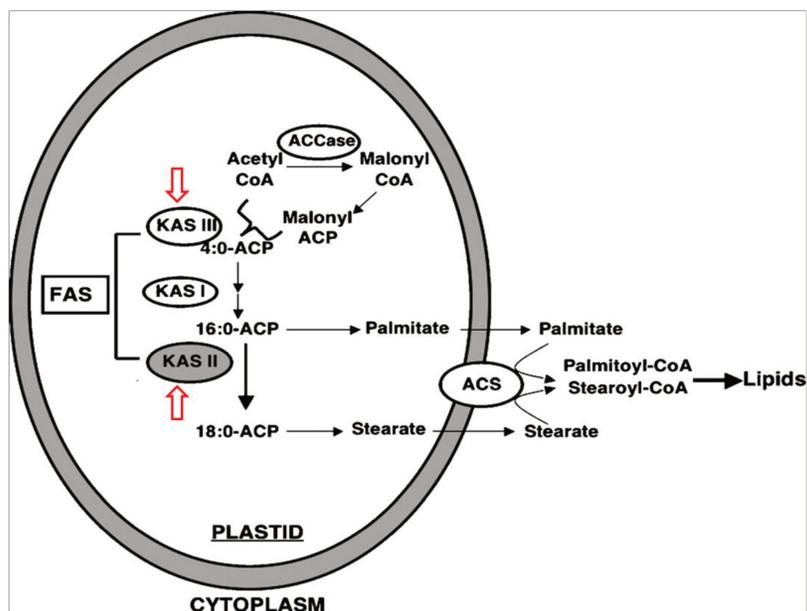


Figura 33. Representação esquemática da via de biossíntese de ácidos graxos em plantas e algas. As setas vermelhas indicam as enzimas escolhidas para terem seus transcritos avaliados. Adaptado de Aghoram e colaboradores (2006).

Os primers foram construídos conforme a metodologia apresentada no tópico 2.8 do Capítulo III e estão apresentados na Tabela 3. Além dos dois genes específicos da via (KAS II e KAS III) escolhemos mais dois genes para controle endógeno: actina (Nematollahi et al., 2006) e CIA5 (Wang et al., 2008). As escolhas foram feitas com base em estudos da biossíntese de ácidos graxos e em revisões bibliográficas. Além desses quatro genes, escolhemos mais outros dois da mesma via, porém testes preliminares mostraram amplificação inespecífica e os mesmos foram descartados.

Tabela 3. Iniciadores empregados no Real-time PCR.

Gene	Orientação	Sequência	%GC	Tamanho	Amplicon
KAS III (FabH)	Forward 1	5' ATTATCGGAAGGAGAGACGCT 3'	47%	21bp	96bp
	Reverse 1	5' ATCAGGTCCACATCTTCT 3'	44%	18bp	
KAS II (FabF)	Forward 1	5' CAGGCGTGCTTGTCTTGAG 3'	57%	20bp	94bp
	Reverse 1	5' GCATCACAAGTGAAGGCG 3'	55%	18bp	
ACTINA	forward	5'CTGTTAGCCTTGGGGTTGAG 3'	55%	20bp	96bp
	Reverse	5' GATCTGGCACCACACCTTCT 3'	55%	20bp	
CIA5	Forward	5' GGCGGCTAAAGGTCCACT 3'	61%	18bp	95bp
	Reverse	5' GCACCTGGGGCAGAACT 3'	58%	17bp	

3.2. Padronização das reações de amplificação e experimento de Real-time PCR

Foram feitos PCRs preliminares a fim de se verificar o funcionamento e especificidade de todos os pares de primers. A Figura 34 mostra o RNA extraído de duas amostras em gel de agarose e as padronizações dos PCRs, mostrando que o cDNA e os primers estavam adequados para a realização do Real-time PCR, amplificando fragmentos específicos na altura correspondente a 100 pares de bases, conforme esperado.

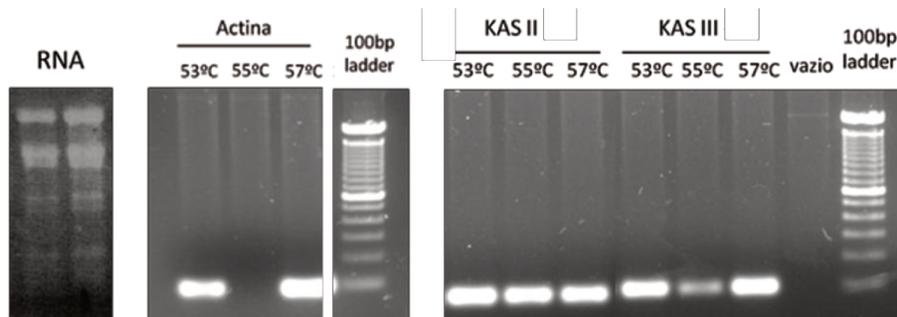


Figura 34. Gel de agarose contendo RNA total de *Neochloris oleoabundans* de duas amostras, à esquerda. As duas bandas superiores correspondem a RNA ribossomal (25S e 18S), as outras a RNA plastidial (23S e 16S). À direita: PCRs de padronização para Real-time PCR. Marcador: 100bp ladder (Invitrogen, EUA).

A técnica de *Real-time PCR* permite o acompanhamento da reação de polimerização e a quantificação relativa dos produtos em cada ciclo. O objetivo é avaliar se há expressão gênica diferencial de KASII e KASIII em privação de nitrogênio em relação à amostra que não sofreu mudança de meio e à que foi transferida para meio novo. As análises dos dados gerados pelo Real-time foram feitos com auxílio da ferramenta de análise de expressão relativa REST (Pfaffl, Horgan et al., 2002) e a Figura 35 mostra os resultados.

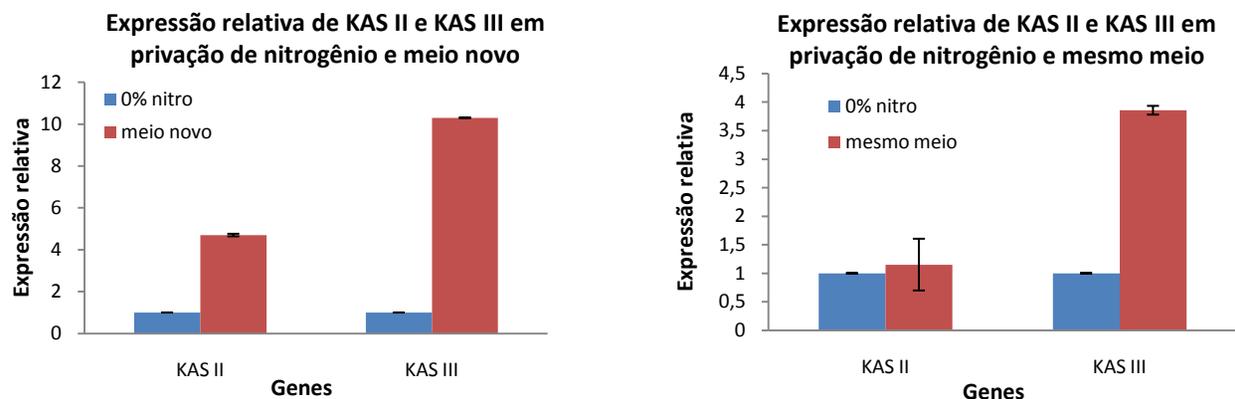


Figura 35. Expressão relativa de KAS II e KAS III em privação de nitrogênio. O valor de 0% nitro foi fixado com expressão em igual a 1, de forma a facilitar a visualização dos resultados.

Curiosamente, observamos que os genes apresentam expressão reprimida na condição de estresse de nitrogênio em relação a ambos os controles (meio novo e mesmo meio). Esses resultados diferem do esperado, pois o fluorímetro mostra que os teores lipídicos da amostra em estresse são muito maiores que os das amostras controle.

Ao buscar respostas na literatura, encontramos indícios de que no estágio avaliado já estaria ocorrendo *feedback* negativo na via de síntese de ácidos graxos (Schuch, 1997). Segundo os autores, quando há estimulação excessiva da síntese (como no caso da privação), o próprio excesso de alguns metabólitos intermediários inicia o processo de *feedback* negativo. Sabe-se que a primeira enzima da via, a Acetil-CoA carboxilase (ACCase), sofre regulação por retroalimentação principalmente pelo palmitoil-CoA (Campbell, 1993) e acredita-se que a KASIII e aKASII também sofram ação direta do excesso de intermediários na célula (Schuch, 1997). Além da regulação alostérica, a via também é regulada a nível via de expressão gênica segundo Campbell (1993), dessa forma acreditamos que a produção excessiva de lipídeos causada pela privação de nitrogênio, e agravada pelo longo período de incubação nessa situação (cinco dias), esteja ativando os mecanismos de *feedback* negativo, por isso a expressão das enzimas já encontra-se reprimida em relação aos controles. A Figura 36 mostra esse mecanismo.

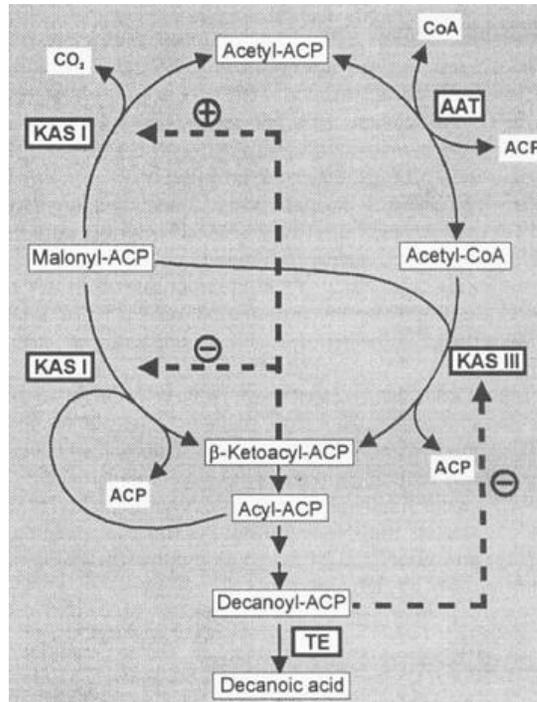


Figura 36. Feedback negativo sobre a via de biossíntese de ácidos graxos. Esquema proposto por Schuch (1997) em seu estudo com sementes de *Cuphea lanceolata*. O excesso de decanoil-ACP, bem como outros ácidos de cadeia média, inibe a atividade da enzima KASIII diretamente.

A partir desses experimentos concluímos que antes de prosseguir com o sequenciamento de RNA e a análise de expressão gênica em larga escala, é necessária a realização de experimentos Real-time PCR em *time-course* com o objetivo de determinar o exato momento onde estão ocorrendo modificações do metabolismo em resposta ao estresse, pois acreditamos que o momento avaliado não correspondia a esse ponto, e sim, um pouco posterior a ele.

4. CONCLUSÕES

Os experimentos de manejo nos mostraram que *N. oleoabundans* apresenta excelente resposta à privação de nitrogênio, aumentando em várias vezes seus teores de lipídeos apolares, efeito que não foi visto para *C. reinhardtii*. Adicionalmente, a espécie parece não responder da mesma forma à privação de fósforo. Através dos experimentos de Real-time PCR observamos que faz-se necessário determinar o momento exato no qual essa espécie promove a adequação de seu metabolismo em resposta a esse

estresse, antes de prosseguir com as análises em larga escala. Por fim, a metodologia fluorimétrica mostrou-se eficaz em comparar indiretamente o conteúdo de lipídeos apolares em *N. oleoabundans*.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

GENOMA DE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS*

1. PANORAMA

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Montagem do genoma de *Neochloris oleoabundans*

2.2. Investigação de simbiose entre *N. oleoabundans* e *Brevundimonas sp.*

2.3. *Neochloris oleoabundans* e vitamina B12

3. CONCLUSÕES

1. PANORAMA

As análises feitas com *Neochloris oleoabundans* em termos de produtividade lipídica, resposta ao manejo de nutrientes e capacidade de seleção artificial sugerem que essa espécie pode ser um organismo adequado para aplicação industrial. Entretanto, para auxiliar na completa domesticação e entendimento da espécie faz-se necessário o sequenciamento do genoma da mesma. Há sequências genômicas completas disponíveis em bases públicas para 15 espécies, dentre elas: a microalga vermelha *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki et al., 2004), a diatomácea *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004) e as algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* (Sabeeha et al., 2007), *Ostreococcus tauri* (Derelle et al., 2006), *Ostreococcus lucimarinus* (Palenik et al., 2007) e *Micromonas sp.* (Worden et al., 2009). Além destes, alguns outros genomas estão em fase de finalização e logo estarão disponíveis.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Montagem do genoma de *Neochloris oleoabundans*

As sequências geradas estão sendo montadas pela equipe de bioinformática do LGE. Análises preliminares mostraram a presença de sequências bacterianas na amostra, indicando que a montagem precisa ser finalizada de maneira cuidadosa a fim de separar sequências de diferentes origens.

A montagem total tem 51Mbp (51 milhões de pares de bases); excluindo *contigs* não classificados como de algas, o tamanho estimado do genoma de *N. oleoabundans* é próximo de 40Mbp, tamanho parecido com *Chlorella vulgaris* (Noutoshi, 1998) e o conteúdo GC (guanina e citosina) médio é de 58%. A Figura 37 ilustra o procedimento adotado para a separação dos *contigs* para a montagem do genoma da alga. A classificação dos *contigs* como provenientes de algas, bacterianos, *no hits* e desconhecidos foi feita através de busca por similaridade. Fragmentaram-se os *contigs* em porções de 300 pares de bases e submeteram-se esses fragmentos à busca por similaridade em banco de dados público (NCBI-nr) em nível de proteína (Blastx).

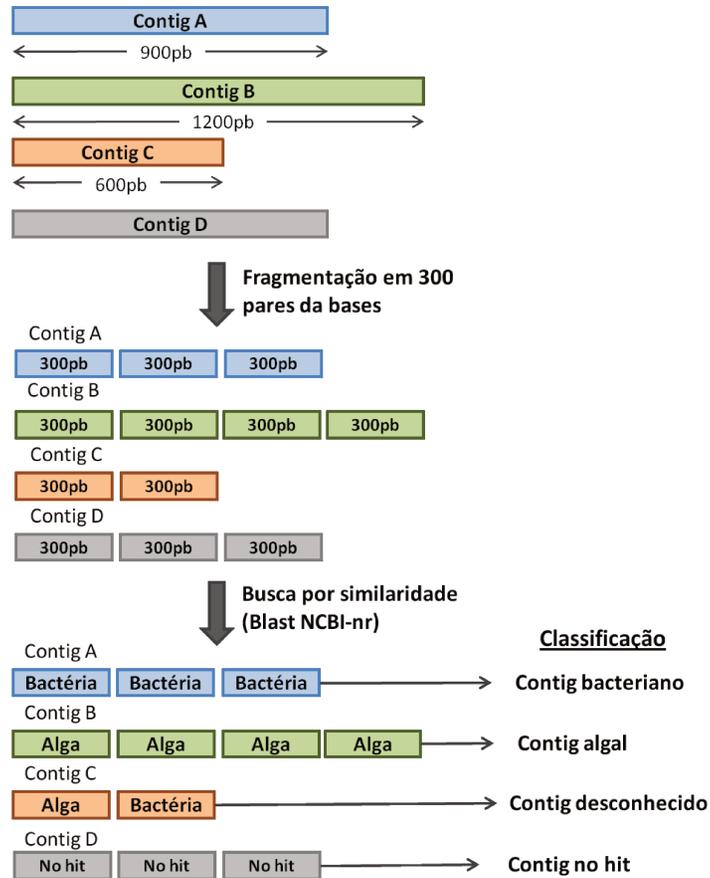


Figura 37. Esquema da classificação dos *contigs* para montagem do genoma.

Uma vez classificados, os *contigs* foram submetidos à análise de GC médio e cobertura. Sequências de alto conteúdo GC combinadas com alta cobertura sugerem origem bacteriana, enquanto baixo CG e cobertura mediana indicam sequência de alga. A Figura 38 mostra um histograma da distribuição das sequências quanto a esses dois parâmetros. As áreas representam as sequências; o eixo x, o conteúdo GC e o eixo y, a cobertura encontrada na montagem. A bactéria encontrada (através de busca por similaridade no NCBI) é do Gênero *Brevundimonas*, próxima de *Breundimonas sp.* BAL3., e não está sequenciada.

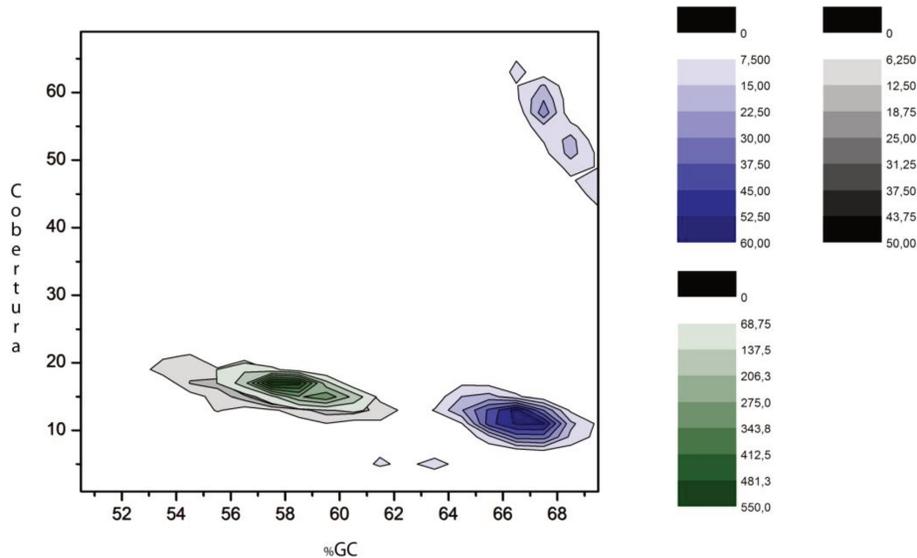


Figura 38. Histograma 2D da distribuição de scaffolds agrupados em Algas (verde), Bactéria (azul) e No-hits (preto) com base em conteúdo GC e cobertura médios.

Notam-se três diferentes agrupamentos de sequências. À esquerda, com CG mais baixo e cobertura de aproximadamente 20 vezes, temos sequências de DNA de alga. À direita temos sequências de GC alto e cobertura média em torno de 12 vezes, possivelmente oriundas de bactéria contaminante. No quadrante superior direito temos GC também elevado e cobertura bastante alta, em torno de 50 vezes, sugerindo sequências oriundas de DNA mitocondrial, plastidial e plasmidial devido às altíssimas coberturas das mesmas. *Contigs* desconhecidos não estão representados nesta figura, justamente por não ser possível sua classificação.

Origem das sequências encontradas na montagem do genoma

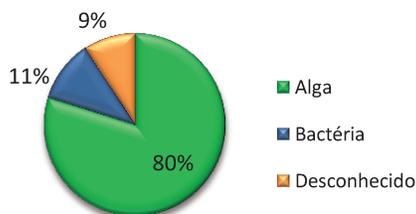


Figura 39. Porcentagem de sequências de diferentes origens encontradas no genoma. “Desconhecido” refere-se aos *contigs* que não foram agrupados nem como de alga nem bacteriano, correspondendo a regiões duvidosas no histograma.

De forma geral, os *first hits* para as sequências de *Neochloris oleoabundans*, em sua maioria, são provenientes de *Chlorella variabilis* ou *C. vulgaris* e não *Chlamydomonas reinhardtii*, como esperávamos. O tamanho do genoma parecido com *C. variabilis* e distante de *C. reinhardtii* (100Mpb) também corrobora a teoria de que *N. oleoabundans* deve ser mais próxima taxonomicamente do gênero *Chlorella* e não *Chlamydomonas*, apesar de ser distante de ambas e da maioria das outras espécies sequenciadas. A escassez de dados reforça a importância do sequenciamento e análise do genoma dessa espécie.

Os resultados do genoma podem ser visualizados no site <<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/algas/>>. Usuário: FAPESP, Senha: projeto_algas.

2.2. Investigação de simbiose entre *N. oleoabundans* e *Brevundimonas sp.*

A presença de sequências provenientes de uma bactéria do gênero *Brevundimonas* na amostra sequenciada atraiu a atenção para esses organismos. Da mesma família do gênero *Caulobacter*, o grupo de bacilos é formado por bactérias gram-negativas capazes de crescer em ambientes pobres em nutrientes, assim como o meio de cultivo das algas.

Park e colaboradores (2008) reportaram um caso de simbiose entre *Brevundimonas sp.* e *Chlorella ellipsoidea*. Os autores isolaram oito espécies diferentes de bactérias naturalmente presentes em um cultivo de *C. ellipsoidea* e testaram os efeitos que a adição de cada uma delas poderia causar no crescimento da mesma. Eles observaram que em presença de *Brevundimonas sp.* o crescimento da microalga mostrou-se três vezes maior em relação ao cultivo puro. Da mesma forma, o crescimento da bactéria também foi melhor em presença da alga. A hipótese levantada é a de que a bactéria estaria produzindo vitamina B12 (cobalamina), cofator essencial para o funcionamento de algumas enzimas da microalga, em troca de nutrientes presentes na parede celular da alga. Na literatura há relatos de outros casos de simbiose justamente pelo fornecimento de vitamina B12 (Croft et al., 2005).

Acreditamos que no caso de *N. oleoabundans* também haja uma relação dessa natureza, uma vez que é extremamente difícil cultivar a alga sem a presença de contaminantes bacterianos e a adição de

carbono orgânico faz com que a população bacteriana se sobressaia rapidamente. A fim de verificar essa hipótese, buscamos evidências genômicas que suportem a teoria.

Existem três enzimas descritas em algas que apresentam necessidade de cobalamina como cofator: metionina sintase (METH), metil malonil-CoA mutase (MCM) e ribonucleotídeo redutase (RNR II) (Banerjee e Ragsdale, 2003; Helliwell et al., 2011). Apesar de essas enzimas ocorrerem em diversos táxons, sabe-se que apenas procariontos possuem a complexa maquinaria enzimática necessária à produção de B12 (Croft, Lawrence et al., 2005), outros organismos precisam consegui-la a partir de fontes exógenas. Algumas espécies possuem ainda enzimas alternativas independentes de cobalamina que exercem a mesma função que o tipo dependente (Croft et al., 2005; Schneider et al., 2008). A existência de ambas as isoenzimas em um organismo é recorrente e a expressão desses isotipos é regulada pela ausência ou presença de B12, como relatado para *C. reinhardtii* (Croft et al., 2005).

Investigamos no genoma de *N. oleoabundans* a existência de genes possivelmente codificantes das três enzimas, além do tipo independente de B12 da metionina sintase. Os resultados estão apresentados nos tópicos subsequentes.

Metionina Sintase Dependente de Cobalamina (METH)

A METH catalisa a última etapa de síntese do aminoácido metionina. A busca pelo seu gene no genoma de *N. oleoabundans* foi feita tendo como referência a sequência de aminoácidos de METH de *Chlamydomonas reinhardtii*. A investigação é realizada através de comparação pelo algoritmo de alinhamento tBlastn que equipara a sequência de aminoácidos de referência contra nossa montagem, indicando as coordenadas do *contig* onde o gene pode estar alocado. Através desses dados, pegamos a possível sequência de *Neochloris oleoabundans* no *contig* indicado e comparamos contra o banco de dados total, em nível de proteína (tBlastx contra o NCBI-nr). A presença de proteínas similares em outras espécies, bem anotadas e descritas de acordo com o esperado, indica que o gene deve estar presente em *N. oleoabundans*. Devemos ressaltar que essa metodologia não deve ser adotada unicamente, apesar de fornecer fortes indícios sobre a presença ou ausência de um gene. Devem-se construir *primers* para validar a existência dos mesmos através de reações de amplificação.

Através da comparação das sequências, sugerimos fortemente que o gene codificante da enzima metionina sintase dependente de cobalamina (METH) esteja presente no genoma de *N. oleoabundans*. A Figura 40 mostra os resultados que levaram a essa conclusão.

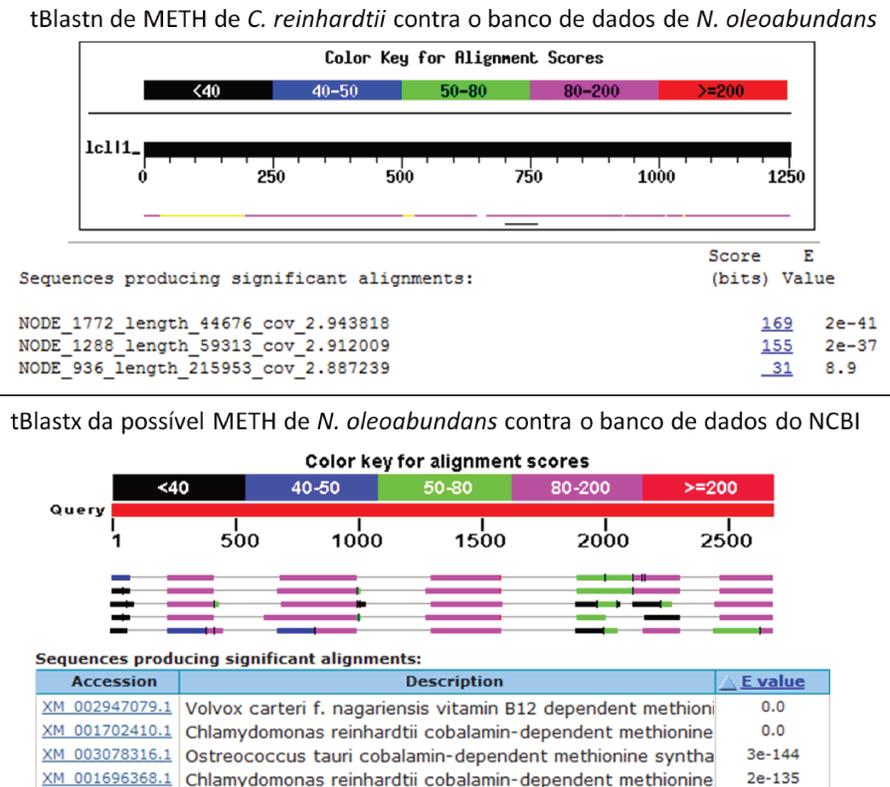


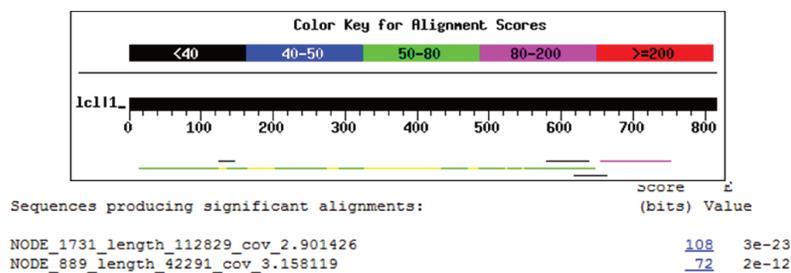
Figura 40. Busca da sequência de METH no genoma de *N. oleoabundans*. Acima: resultado da busca de METH no genoma de *N. oleoabundans* a partir da METH de *C. reinhardtii*. Abaixo: tBlastx da região indicada como similar do *contig 1772* contra o banco de dados do NCBI.

A Figura 40 nos mostra que no *contig 1772* há uma região de similaridade com a METH de *C. reinhardtii*. Após o download da sequência contida nesse intervalo, comparamos a mesma com o banco de dados do NCBI e encontramos similaridade com METH de diversos organismos, como as microalgas *Volvox carteri*, *Ostreococcus tauri*, além de *C. reinhardtii*. Como a comparação foi feita em nível de proteínas, acredita-se que as regiões onde não há similaridade representem os íntrons.

Fizemos o mesmo procedimento para a MET independente de B12 (METE) e encontramos fortes indícios de que o possível modelo gênico não esteja presente no genoma de *N. oleoabundans* (Figura 41). Apesar de ser uma proteína grande e geralmente conservada em toda a sua extensão, conforme mostra a

Figura 42, encontramos apenas uma pequena região de aproximadamente 250 pares de bases em *N. oleoabundans* similar à sequência de referência. Ao investigar essa porção, observamos que a mesma trata-se da região N-terminal da proteína. Essa região contém o sítio de ligação ao substrato, porém para o funcionamento da enzima a presença da porção C-terminal também é essencial (InterProScan, EBI). Esse domínio também é encontrado na família Urod, presente na enzima Uroporphyrinogen decarboxylase que participa do metabolismo da clorofila.

tBlastn da METE de *C. reinhardtii* contra o banco de dados de *N. oleoabundans*



tBlastx da sequência de *N. oleoabundans* contra o NCBI

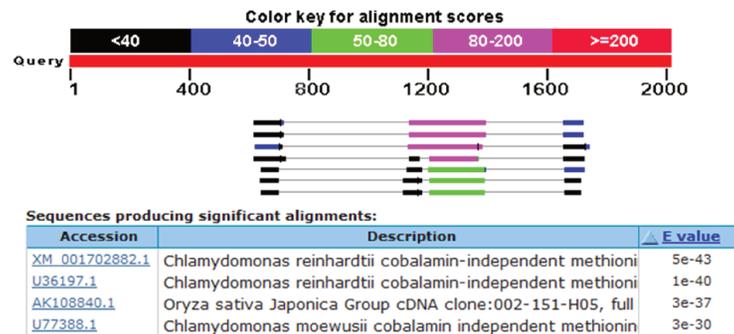


Figura 41. Busca da sequência de METE no genoma de *Neochloris oleoabundans*. Acima: o resultado da busca de METE no genoma de *N. oleoabundans* apresenta baixa similaridade. Abaixo: tBlastx da sequência de *N. oleoabundans* indicada (contig 1731) contra o banco de dados do NCBI mostra que apenas uma pequena região apresenta-se conservada (domínio N-terminal).

A Figura 42 mostra que a proteína METE de *C. reinhardtii* tem diversas regiões conservadas, ao contrário do que foi observado para a região indicada no genoma de *N. oleoabundans*.

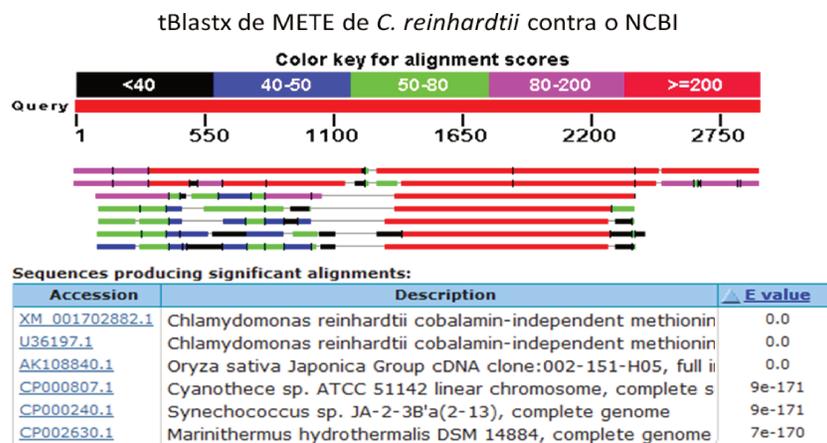


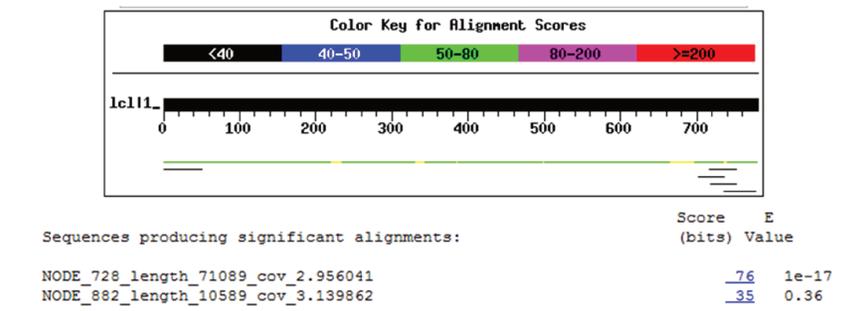
Figura 42. Comparação da sequência de cDNA de METE de *Chlamydomonas reinhardtii* contra o NCBI. Nota-se que a sequência apresenta diversas regiões conservadas em vários organismos diferentes.

Metil Malonil-CoA Mutase Dependente de Cobalamina (MCM)

A MCM participa do metabolismo de diversos aminoácidos e também requer vitamina B12 como cofator. Já foi relatada em *C. reinhardtii*, *T. pseudonana* (Smith, 2005) e *Chlorella variabilis*, de onde obtivemos a sequência de referência. A metodologia para detecção do possível gene codificante desta enzima aplicada foi a mesma usada para a METH e METE.

Devido à presença de várias regiões de similaridade acreditamos que o *contig* 728 possa alocar esse gene em *Neochloris oleoabundans*. Entretanto, apesar de sugerirmos a existência do mesmo, a validação por PCR se faz necessária. A Figura 43 mostra os resultados.

tBlastn da MCM de *Chlorella variabilis* contra *N. oleoabundans*



tBlastx da possível sequência de MCM de *N. oleoabundans* contra o NCBI

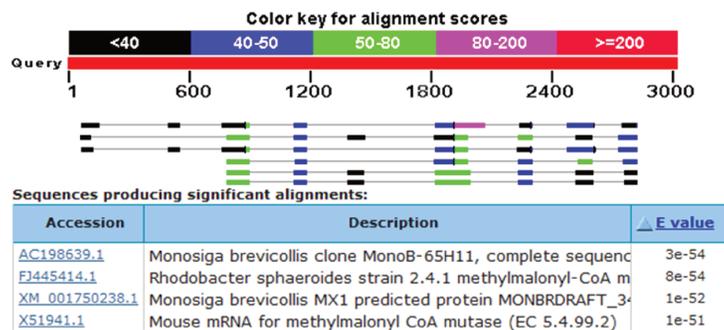
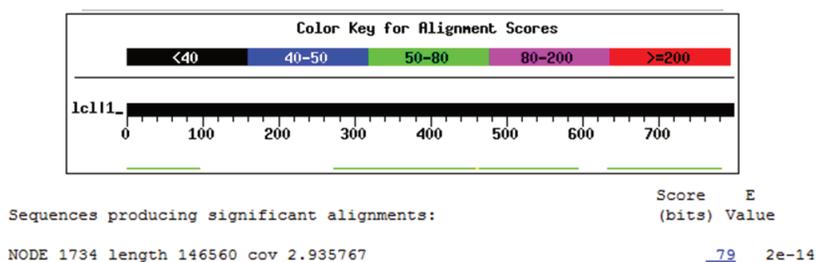


Figura 43. Busca da sequência de MCM no genoma de *Neochloris oleoabundans*. Acima: resultado da busca de MCM na nossa montagem a partir da sequência referência de *Chlorella variabilis*. Abaixo: tBlastx da região indicada do *contig* 728 contra o banco de dados do NCBI. Ambas as comparações mostram similaridade, sugerindo que a enzima pode estar presente no genoma da alga.

Ribonucleotídeo Redutase Tipo II (RNR II)

Essa enzima participa do metabolismo das bases nitrogenadas e já foi reportada em *Ectocarpus siliculosus* (Helliwell et al., 2011). Além do tipo dependente de B12 (RNR II) há o isotipo independente (RNR I). A Figura 44 mostra os resultados das comparações de sequências. A sequência referência é de *Ectocarpus siliculosus*, a única microalga sequenciada que apresenta esse isotipo da enzima (Helliwell et al., 2011).

tBlastn de RNR II de *Ectocarpus siliculosus* contra *N. oleabundans*



tBlastx da sequência de *N. oleabundans* contra o NCBI

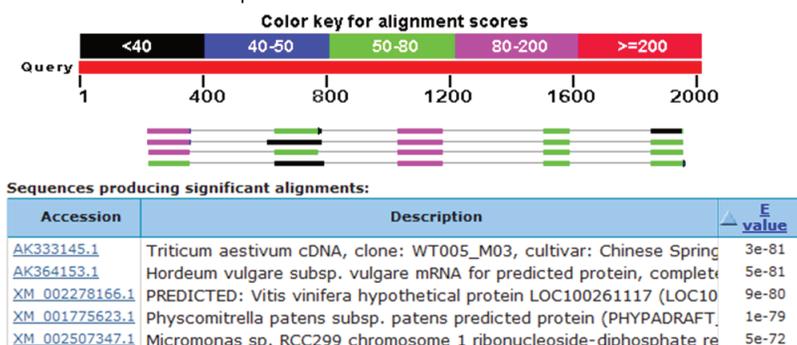


Figura 44. Busca da sequência de RNR II no genoma de *Neochloris oleabundans*. Acima: resultado da busca de RNR II na nossa montagem a partir da sequência referência de *Ectocarpus siliculosus*. Abaixo: tBlastx da região indicada do *contig* 1734 contra o banco de dados do NCBI sugere similaridade com o tipo I da enzima (independente de B12).

A busca em *N. oleabundans* retorna o *contig* 1734 e ao comparar a região indicada desse *contig* contra o NCBI observamos que há similaridade com o tipo de RNR independente de B12, não com o dependente. Pegamos então a sequência de RNR I de *C. reinhardtii* e buscamos similaridade no genoma de *N. oleabundans*, a busca retorna o mesmo *contig* que o indicado no primeiro procedimento (Figura 45), com similaridade ainda maior, reforçando a hipótese de que há o tipo independente, não o dependente.

tBlastn de RNR I de *C. reinhardtii* contra o genoma de *N. oleoabundans*

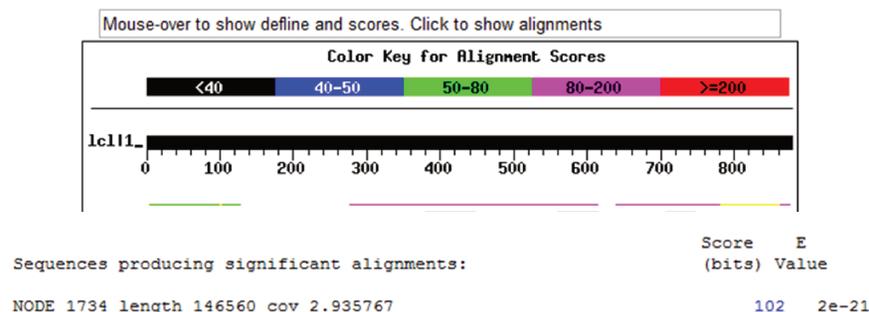


Figura 45. tBlastn da RNR tipo I (independente de B12) de *Chlamydomonas reinhardtii* contra o genoma de *Neochloris oleoabundans*. O resultado sugere que esse gene pode estar presente no genoma.

A existência do gene codificante do isotipo I ou II da RNR deve ser validada de forma cuidadosa, pois só há uma espécie de microalga sequenciada que apresenta a forma dependente de B12 (*Ectocarpus siliculosus*) e a mesma não é próxima de *N. oleoabundans* evolutivamente.

2.3. *Neochloris oleoabundans* e vitamina B12

A presença de enzimas dependentes de vitamina B12 e a ausência de rotas de produção da mesma indicam a importância da possível simbiose com a bactéria. Estudos feitos com aproximadamente 300 espécies de microalgas revelaram que mais de 50% apresenta necessidade de vitamina B12 (Croft, Lawrence et al., 2005), sendo que a concentração dessa vitamina encontrada livre nas águas doces e marinhas é insuficiente para suprir a demanda.

Atualmente, Helliwell (2011) investigou a evolução da auxotrofia de vitamina B12 nas 15 espécies de microalgas cujo genoma está sequenciado. Eles reuniram dados da literatura e buscaram sequências de genes codificantes de enzimas dependentes de B12 no genoma das diferentes espécies, confirmando a necessidade desse nutriente para o metabolismo de algumas. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos pelos autores, de forma similar ao que fizemos para *N. oleoabundans*.

Group	Species	Genes Encoding B ₁₂ -dependent Enzymes				B ₁₂ Dependent? ⁴
		METE	METH	RNR		
				II	MCM	
Chlorophyta	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> [2]	✓ ¹	✓	x	x	x[3,4]
	<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i> EVE [5]	Pseudo ₂	✓	x	x	✓[1]
	<i>Micromonas pusilla</i> (CCMP 1545) [6]	x	✓	x	x	✓[1]
	<i>Ostreococcus tauri</i> (OTH95)	x	✓	x	x	✓[1]
	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> [7]	x	✓	x	x	?
	<i>Ostreococcus</i> sp. RCC809 [7]	x	✓	x	x	✓[1]
	<i>Coccomyxa</i> sp. C-169	✓	x	x	x	x [8]
	<i>Chlorella variabilis</i> NC64A	✓	✓	x	✓	?
Chromalveolata	<i>Emiliana huxleyi</i> (CCMP1516)	x	✓	x	✓	x[1, 9, 10]
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (CCAP1055/1) [11]	✓	✓	x	✓	x [12]
	<i>Fragilariopsis cylindrus</i> (CCMP 1102) [13]	✓	Partial ₃	x	✓	x [1]
	<i>Thalassiosira pseudonana</i> [14]	x	✓	x	✓	✓[15]
	<i>Ectocarpus siliculosus</i> [16]	✓	✓	✓	✓	x [17]
	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	x	Partial	x	✓	✓[18]
Rhodophyta	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> [19]	✓	x	x	x	x[15]

Tabela 4. Tabela mostrando a existência de genes dependentes de B12 no genoma de 15 espécies de microalgas. Na última coluna os autores classificam as espécies em dependentes ou independentes de vitamina B12. O “x” significa ausência e o ✓ indica presença.

Ao notarmos a possível necessidade de vitamina B12 no metabolismo de *Neochloris oleoabundans* a partir de análises genômicas, fizemos a suplementação do meio BBM com esse nutriente (dados não apresentados). Testamos quatro concentrações de acordo com o que é descrito na literatura e notamos que o controle crescia ligeiramente melhor que os cultivos suplementados. Acreditamos que, assumindo a hipótese da simbiose como verdadeira, a bactéria seja capaz de suprir a demanda por B12, sendo que a adição de vitamina extra não alteraria significativamente o crescimento. Por fim, apesar de sugerirmos a presença desses genes no genoma da alga, achamos precipitado definir se ela apresenta ou não necessidade de B12. Testes mais completos devem ser feitos para definir esse parâmetro.

3. CONCLUSÕES

Análises preliminares do genoma sugerem que a espécie seja mais próxima do gênero *Chlorella*. Adicionalmente, foi detectada a presença de sequências oriundas de uma bactéria do gênero *Brevundimonas*, sugerindo uma relação de dependência entre a alga e a bactéria em função da produção de vitamina B12. Sequências de genes codificantes de enzimas dependentes desse cofator parecem estar presentes no genoma da alga, fortalecendo a hipótese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os experimentos realizados mostraram melhora nas taxas de crescimento de *Neochloris oleoabundans*. Acreditamos que, em partes, esse aumento ocorreu em função da seleção de células mais velozes e sua contínua replicação.

Vimos também que a metodologia fluorimétrica é eficaz em comparar indiretamente o conteúdo de lipídeos apolares nos diferentes tratamentos. Os experimentos de manejo nos mostraram que a espécie apresenta excelente resposta à privação de nitrogênio, aumentando em várias vezes seus teores de lipídeos apolares. Porém, a privação desse nutriente por período muito longo pode desencadear *feedkack* negativo na via de síntese de ácidos graxos, como sugerem os resultados de expressão gênica.

Por fim, o genoma mostra a possível existência de uma relação simbiótica entre a alga e uma bactéria em função da obtenção de vitamina B12. A possível presença de enzimas dependentes desse cofator no genoma da alga corrobora a hipótese.

Concluimos que a espécie é promissora para o setor energético, apresentando capacidade de melhorar as taxas de crescimento, além de resposta excelente à privação de nitrogênio.

Propomos como continuação do trabalho:

1. Término da análise do genoma, com a predição de genes e finalização da montagem.
2. Análise da expressão gênica em privação de nitrogênio por Real-time PCR em *time-course*, a fim de determinar o ponto onde a via de biossíntese de lipídeos se encontra mais estimulada e então, sequenciar o RNA em larga escala.
3. Montagem de estratégia de manipulação genética com base nos dados de expressão gênica a serem gerados pelo sequenciamento de RNA
4. Investigação profunda da relação entre a alga e a bactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghoram, K., R. F. Wilson, et al. (2006). "A Mutation in a 3-Keto-Acyl-ACP Synthase II Gene is Associated with Elevated Palmitic Acid Levels in Soybean Seeds." Crop Sci. **46**(6): 2453-2459.
- Andersen, R. (2005). Algal Culturing Techniques. West Boothbay Harbor, ME USA, Elsevier.
- Andrade, J. B. d., E. Ferrari Junior, et al. (2004). "Composição química de genótipos de cana-de-açúcar em duas idades, para fins de nutrição animal." Bragantia **63**: 341-349.
- Andrich, G., U. Nesti, et al. (2005). "Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp." European Journal of Lipid Science and Technology **107**(6): 381-386.
- Araújo, O. Q. F., C. N. Gobbi, et al. (2009). "Assessment of the impact of salinity and irradiance on the combined carbon dioxide sequestration and carotenoids production by *Dunaliella salina*: A mathematical model." Biotechnology and Bioengineering **102**(2): 425-435.
- Au, S., S. Shih, et al. (2011). "Integrated microbioreactor for culture and analysis of bacteria, algae and yeast." Biomedical Microdevices **13**(1): 41-50.
- Ball, S. G. (2005). "Eukaryotic Microalgae Genomics. The Essence of Being a Plant." Plant Physiology **137**(2): 397-398.
- Banerjee, R. and S. W. Ragsdale (2003). "THE MANY FACES OF VITAMIN B12: CATALYSIS BY COBALAMIN-DEPENDENT ENZYMES 1." Annual Review of Biochemistry **72**(1): 209-247.
- Beal, C. M., M. E. Webber, et al. (2010). "Lipid analysis of *Neochloris oleoabundans* by liquid state NMR." Biotechnology and Bioengineering **106**(4): 573-583.
- Benemann, J. R. (1996). Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. 4th Quarterly technical progress report. Conference: US/Japan meeting on coal energy research, Albuquerque, NM (United States), 26-30 Sep 1994; Other Information: PBD: 28 Dec 1994; Medium: ED; Size: 9 p.
- Bennett, S. (2004). "Solexa Ltd." Pharmacogenomics **5**(4): 433-438.
- Biodieselbr (2008). Biocombustíveis - Da primeira a quarta geração. Biodieselbr.
- Biodieselbr. (2011). "Energia." Panorama energético atual e perspectivas futuras, from <http://www.biodieselbr.com/energia/agro-energia.htm>.
- Black, J. G. (1996). Microbiology. Principles and Applications. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.
- Borowitzka, M. (1988). Fats, oils and hydrocarbons. Cambridge, Cambridge University Press.
- Borowitzka, M. (1995). "Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds." Journal of Applied Phycology **7**(1): 3-15.
- Briggs, M. (2004) "Widescale Biodiesel Production from Algae."
- Broun, P. and C. Somerville (2001). "Progress in plant metabolic engineering." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(16): 8925-8927.
- Campbell, P. N. (1993). "Principles of biochemistry second edition, by A L Lehninger, D L Nelson and M M Cox. Pp 1013. Worth, New York. 1993. £30 ISBN 0-87901-500-4." Biochemical Education **21**(2): 114-114.
- Carroll, A. and C. Somerville (2009). "Cellulosic Biofuels." Annual Review of Plant Biology **60**(1): 165-182.
- Carvalho, J. F. (2005). "Fotossíntese e energias renováveis." Retrieved 08 Março, 2009, from ftp://ftp2.biblioteca.cbpf.br/pub/apub/2005/cs/cs_zip/cs00105.pdf.
- Chan, C. X. B., D. (2010) "The Origin of Plastids." Nature Education **3**, 84.
- Chen, W., C. Zhang, et al. (2009). "A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae." Journal of Microbiological Methods **77**(1): 41-47.
- Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." Biotechnology Advances **25**(3): 294-306.
- Clarkson, D. T. M. H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. second edition, Annals of Botany.
- Coutinho, L. (2004). Cada vez mais quente. Veja. on line, Editora Abril.
- Croft, M. T., A. D. Lawrence, et al. (2005). "Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria." Nature **438**(7064): 90-93.
- da Silva, T., A. Reis, et al. (2009). "Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry." Applied Biochemistry and Biotechnology **159**(2): 568-578.
- Derner, R. B., S. Ohse, et al. (2006). "Microalgas, produtos e aplicações." Ciência Rural **36**: 1959-1967.
- Dietz, K.-J. and T. Pfannschmidt (2011). "Novel Regulators in Photosynthetic Redox Control of Plant Metabolism and Gene Expression." Plant Physiology **155**(4): 1477-1485.
- ExxonMobil (2008) "Panorama energético e perspectivas para 2030." **1**.
- Favaro, D. D. e. T. (2007). O nosso é real. O de Bush é blablablá. Veja, Editora Abril.
- Field, C. B., M. J. Behrenfeld, et al. (1998). "Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components." Science **281**(5374): 237-240.
- Fogg, G. E. C., H. (1966). "Algal Cultures and Phytoplankton Ecology." Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie **51**(1): 203-204.
- Gao, Y. Y. e. K. (2003). "Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. (Chlorophyta)." Journal of Applied Phycology **15**.
- Gavrilescu, M. and Y. Chisti (2005). "Biotechnology--a sustainable alternative for chemical industry." Biotechnology Advances **23**(7-8): 471-499.

- Gil (2009). Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. São Paulo-SP.
- Gorman, D. S., and R. P. Levine. (1965). "Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **54**: 5.
- Gouveia, L., A. Marques, et al. (2009). "Neochloris oleabundans: UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **36**(6): 821-826.
- Griffiths, M. and S. Harrison (2009). "Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production." Journal of Applied Phycology **21**(5): 493-507.
- Grossman, A. R., D. Gonzalez-Ballester, et al. (2010). Responses to Macronutrient Deprivation. Abiotic Stress Adaptation in Plants. A. Pareek, S. K. Sopory and H. J. Bohnert, Springer Netherlands: 307-348.
- Guschina, I. A. and J. L. Harwood (2006). "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae." Progress in Lipid Research **45**(2): 160-186.
- HALLMANN, A. (2007). "Algal transgenics and biotechnology" Transgenic Plant Journal **1**(1): 18.
- Helliwell, K. E., G. L. Wheeler, et al. (2011). "Insights into the Evolution of Vitamin B12 Auxotrophy from Sequenced Algal Genomes." Molecular Biology and Evolution.
- Herzog, H. J. and E. M. Drake (1996). "CARBON DIOXIDE RECOVERY AND DISPOSAL FROM LARGE ENERGY SYSTEMS." Annual Review of Energy and the Environment **21**(1): 145-166.
- Holcomb, R., L. Mason, et al. (2011). "Culturing and investigation of stress-induced lipid accumulation in microalgae using a microfluidic device." Analytical and Bioanalytical Chemistry **400**(1): 245-253.
- Hu, Q. (2007). Environmental Effects on Cell Composition. Handbook of Microalgal Culture. Blackwell Publishing Ltd: 83-94.
- Hu, Q., M. Sommerfeld, et al. (2008). "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances." The Plant Journal **54**(4): 621-639.
- Huang, Y. Y., C. M. Beal, et al. (2010). "Micro-Raman spectroscopy of algae: Composition analysis and fluorescence background behavior." Biotechnology and Bioengineering **105**(5): 889-898.
- Hughes, E. and J. R. Benemann (1997). "Biological fossil CO₂ mitigation." Energy Conversion and Management **38**(Supplement 1): S467-S473.
- IEA. "International Energy Agency." from <http://www.iea.org/>.
- Iyovo GD, D. G., Chen J (2010). "Poultry Manure Digestate Enhancement of *Chlorella Vulgaris* Biomass Under Mixotrophic Condition for Biofuel Production." J Microbial Biochem Technol **2**: 7.
- Jameson, I. (2005) "Algal growth phases including determination of the growth rate and population doubling time."
- Jaworski, J. and E. B. Cahoon (2003). "Industrial oils from transgenic plants." Current Opinion in Plant Biology **6**(2): 178-184.
- Kapdan, I. K. and F. Kargi (2006). "Bio-hydrogen production from waste materials." Enzyme and Microbial Technology **38**(5): 569-582.
- Khozin-Goldberg, I. and Z. Cohen (2006). "The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water euglenoid *Monodus subterraneus*." Phytochemistry **67**(7): 696-701.
- Klare, M. T. (2011). "The Collapse of the Old Oil Order" How the Petroleum Age Will End Retrieved 12 Maio, 2011, from http://www.tomdispatch.com/blog/175362/tomgram%3Amichael_klare%2C_oilquake_in_the_middle_east.
- Lakeman, M. B., Cattolico, et al. (2007). "CRYPTIC DIVERSITY IN PHYTOPLANKTON CULTURES IS REVEALED USING A SIMPLE PLATING TECHNIQUE." Journal of Phycology **43**(4): 662-674.
- LARKUM, A. W. D. (1981). Marine plant productivity Marine Botany: an Australian perspective. M. C. a. R. J. King. Longman Cheshire, Melbourne. **1**: 369- 385.
- Levich, N. G. B. a. A. P. (1999). "The nitrogen:phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure." Archiv für Hydrobiologie **146**(1): 19.
- Levine, R. B., M. S. Costanza-Robinson, et al. (2011). "Neochloris oleoabundans grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production." Biomass and Bioenergy **35**(1): 40-49.
- Li, Y., D. Han, et al. (2010). "Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*." Biotechnology and Bioengineering **107**(2): 258-268.
- Li, Y., M. Horsman, et al. (2008). "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*." Applied Microbiology and Biotechnology **81**(4): 629-636.
- Lobban, C. S. (1988). Cell counting. Experimental Phycology: A Laboratory Manual. D. J. C. a. B. P. Kremer, Cambridge University Press. **1**: 320.
- Luiz Trabulsi, F. A., Olga Gompertz, José Alberto Candeia (2008). Microbiologia. São Paulo, Editora Atheneu.
- Magneschi, L. (2008). "Chlamydomonas RNA and DNA extraction." Retrieved 11 June 2011, 2011, from <http://www.plantlab.sssup.it/chlamydomonas-protocols>.
- Mendham J. D. R., Barnes JD, Thomas MJK. (2002). Vogel - Análise Química Quantitativa. Rio de Janeiro
- Metzger, P. and C. Largeau (2005). "Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids." Applied Microbiology and Biotechnology **66**(5): 486-496.
- Michod, R. and D. Roze (2001). "Some Aspects of Reproductive Mode and Origin of Multicellularity." Selection **1**(1): 97-110.
- MME, M. d. M. e. E. (2011). Ranking Mundial de Energia e Socioeconomia. S. D. P. E. D. E. N. d. E. d. Energia. Brasília, MME.
- Moore, R., Clark, W. D., Kingsley, R. S., and Vodopich, D., (1995). Botany. Wm. C. Brown.
- Murray, K., F. Healy, et al. (2011). "Biomass production and nutrient uptake by *Neochloris oleoabundans* in an open trough system." Applied Microbiology and Biotechnology **90**(1): 89-95.

- Nematollahi, G., A. Kianianmomeni, et al. (2006). "Quantitative analysis of cell-type specific gene expression in the green alga *Volvox carteri*." *BMC Genomics* **7**(1): 321.
- Nichols, H. W. and H. C. Bold (1965). "Trichosarcina polymorpha Gen. et Sp. Nov." *Journal of Phycology* **1**(1): 34-38.
- Pacheco, T. F. (2011). "Produção de etanol: primeira ou segunda geração?" *Ambiente Energia* Retrieved 19 Junho, 2011, from <http://www.ambienteenergia.com.br/index.php/2011/04/producao-de-etanol-primeira-ou-segunda-geracao/10885>.
- Palenik, B., J. Grimwood, et al. (2007). "The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(18): 7705-7710.
- Park, Y., K.-W. Je, et al. (2008). "Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga." *Hydrobiologia* **598**(1): 219-228.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002). "Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic Acids Research* **30**(9): e36.
- Pruvost, J., J. Legrand, et al. (2002). "Simulation of microalgae growth in limiting light conditions: Flow effect." *AIChE Journal* **48**(5): 1109-1120.
- Pruvost, J., G. Van Vooren, et al. (2009). "Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor." *Bioresource Technology* **100**(23): 5988-5995.
- Pruvost, J., G. Van Vooren, et al. (2011). "Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application." *Bioresource Technology* **102**(1): 150-158.
- Ratledge, C. and Z. Cohen (2008). "Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils?" *Lipid Technology* **20**(7): 155-160.
- Richardson, B., D. M. Orcutt, et al. (1969). "Effects of Nitrogen Limitation on the Growth and Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture." *Appl. Environ. Microbiol.* **18**(2): 245-250.
- Rittmann, B. E. (2008). "Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms." *Biotechnology and Bioengineering* **100**(2): 203-212.
- Rodolfi, L., G. Chini Zittelli, et al. (2009). "Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor." *Biotechnology and Bioengineering* **102**(1): 100-112.
- Rodrigue, J.-P. (2011). "The Geograpy of Transport Systems." *Evolution of energy sources* Retrieved 03 Junho 2011, 2011, from <http://people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/evolenergy.html>.
- Roessler, P. G. (1990). "ENVIRONMENTAL CONTROL OF GLYCEROLIPID METABOLISM IN MICROALGAE: COMMERCIAL IMPLICATIONS AND FUTURE RESEARCH DIRECTIONS." *Journal of Phycology* **26**(3): 393-399.
- Roessler, P. G., L. M. Brown, et al. (1994). Genetic Engineering Approaches for Enhanced Production of Biodiesel Fuel from Microalgae. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, American Chemical Society. **566**: 255-270.
- Rosenberg, J. N., G. A. Oyler, et al. (2008). "A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution." *Current Opinion in Biotechnology* **19**(5): 430-436.
- Rowley, W. M. (2010). *Nitrogen and Phosphorus Biomass-Kinetic Model for Chlorella vulgaris in a Biofuel Production Scheme*. Masters, School of Engineering and Management.
- Rubio, V., F. Linhares, et al. (2001). "A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae." *Genes & Development* **15**(16): 2122-2133.
- Sager, R. G., S. (1953). "Nutritional Studies with *Chlamydomonas Reinhardi*." *Annals of the New York Academy of Sciences* **56**(5): 8.
- Sawayama, S., S. Inoue, et al. (1995). "CO₂ fixation and oil production through microalga." *Energy Conversion and Management* **36**(6-9): 729-731.
- Schenk, S., M. Dzierzawa, et al. (2008). "Successes and failures of Bethe ansatz density functional theory." *Physical Review B* **78**(16): 165102.
- Schneider, M. J., M. Ulland, et al. (2008). "A Protein Methylation Pathway in *Chlamydomonas* Flagella Is Active during Flagellar Resorption." *Mol. Biol. Cell* **19**(10): 4319-4327.
- Schuch, R. W., Elke Brück, Fritzi Maike Brummel, Monika Spener, Friedrich (1997). "β-Ketoacyl-acyl carrier protein synthases in the regulation of fatty acid synthase activity in higher plants — An overview." *Lipid / Fett* **99**(8): 278-281.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., and Roessler, P. (1998). "A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae " *U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development* **1**: 328.
- Shifrin, N. S. and S. W. Chisholm (1981). "PHYTOPLANKTON LIPIDS: INTERSPECIFIC DIFFERENCES AND EFFECTS OF NITRATE, SILICATE AND LIGHT-DARK CYCLES1." *Journal of Phycology* **17**(4): 374-384.
- Silvana Ohse, R. B. D., Renata Ávila Ozório, Maurício Villela da Costa Braga, Paulo Cunha, Claudia Pavan Lamarca, Márcia Estevão dos Santos (2008). "Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário." *Biotemas* **21**(2): 11.
- Simeonova, K. and H. Diaz-Bone (2005). "Integrated climate-change strategies of industrialized countries." *Energy* **30**(14): 2537-2557.
- Siripornadulsil, S., S. Traina, et al. (2002). "Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae." *The Plant Cell Online* **14**(11): 2837-2847.
- Skaletsky, S. R. a. H. J. (2000). *Primer3, WWW for general users and for biologist programmers*. Totowa, NJ, Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*.

- Sorgeloos, P. L. a. P., Ed. (1996). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. Ghent, Belgium, Food and Agriculture Organization of the United Nation - FAO.
- Spoehr, H. A. and H. W. Milner (1949). "THE CHEMICAL COMPOSITION OF CHLORELLA; EFFECT OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS." Plant Physiology **24**(1): 120-149.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, et al. (2006). "Commercial applications of microalgae." Journal of Bioscience and Bioengineering **101**(2): 87-96.
- Stanke, M., M. Diekhans, et al. (2008). "Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding." Bioinformatics **24**(5): 637-644.
- Stephens, E., I. Ross, et al. (2010). "An economic and technical evaluation of microalgal biofuels." Nature Biotechnology **28**(2): 126-128.
- Swenson, W., J. Arendt, et al. (2000). "Artificial selection of microbial ecosystems for 3-chloroaniline biodegradation." Environmental Microbiology **2**(5): 564-571.
- Taris, N., F. M. Batista, et al. (2007). "Evidence of response to unintentional selection for faster development and inbreeding depression in *Crassostrea gigas* larvae." Aquaculture **272**(Supplement 1): S69-S79.
- Teixeira, C. M., Teixeira, P.C., ROCHA, H., ALMEIDA, A.G., e BRITO, G.F. (2007a). Um Novo Sistema de Cultivo de Microalgas para a Produção de Biodiesel. II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel.
- Tiraboschi, J. (2009). Biocombustível ou comida? Galileu.
- Tissot, B. P. and D. H. Welte (1984). Petroleum formation and occurrence. Berlin; New York, Springer-Verlag.
- Tolmasquim, M. T., A. Guerreiro, et al. (2007). "Matriz energética brasileira: uma prospectiva." Novos Estudos - CEBRAP: 47-69.
- Tornabene TG, H. G., Lien S, Burris N (1983). " Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans* ." Enzyme Microb Technol **5**: 5.
- Tran, H.-L., J.-S. Kwon, et al. (2009). "Optimization for the growth and the lipid productivity of *Botryococcus braunii* LB572." Journal of Bioscience and Bioengineering **108**(Supplement 1): S55-S55.
- Tredici, M. and R. Materassi (1992). "From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms." Journal of Applied Phycology **4**(3): 221-231.
- Ugwu, C. U., H. Aoyagi, et al. (2008). "Photobioreactors for mass cultivation of algae." Bioresource Technology **99**(10): 4021-4028.
- UTEX. "The Culture Collection of Algae." Retrieved 06/06, 2011, from <http://web.biosci.utexas.edu/utex/>.
- Wahal, S. and S. Viamajala (2010). "Maximizing Algal Growth in Batch Reactors Using Sequential Change in Light Intensity." Applied Biochemistry and Biotechnology **161**(1): 511-522.
- Walker, T., S. Purton, et al. (2005). "Microalgae as bioreactors." Plant Cell Reports **24**(11): 629-641.
- Wang, B. and C. Q. Lan (2011). "Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent." Bioresource Technology **102**(10): 5639-5644.
- Wang, Y., I. Ladunga, et al. (2008). "The Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO) and SUMO-Conjugating System of *Chlamydomonas reinhardtii*." Genetics **179**(1): 177-192.
- Wang, Z. T., N. Ullrich, et al. (2009). "Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii*." Eukaryotic Cell **8**(12): 1856-1868.
- Win, S. S., A. Impoolsup, et al. (1996). "Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fedbatch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **16**(2): 117-123.
- Worden, A. Z., J.-H. Lee, et al. (2009). "Green Evolution and Dynamic Adaptations Revealed by Genomes of the Marine Picoeukaryotes *Micromonas*." Science **324**(5924): 268-272.
- Xia, J. and K. Gao (2003). "Effects of doubled atmospheric CO₂ concentration on the photosynthesis and growth of *Chlorella pyrenoidosa* cultured at varied levels of light." Fisheries Science **69**(4): 767-771.
- Xiaodong Deng, X. F. a. Y. L. (2011). "The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*." African Journal of Microbiology Research **5**(3): 10.
- Zerbino, D. R. and E. Birney (2008). "Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs." Genome Research **18**(5): 821-829.
- Zhila, N. O., G. S. Kalacheva, et al. (2005). "Effect of Nitrogen Limitation on the Growth and Lipid Composition of the Green Alga <i>Botryococcus braunii</i>." Russian Journal of Plant Physiology **52**(3): 311-319.
- Zwietering, M. H., I. Jongenburger, et al. (1990). "Modeling of the Bacterial Growth Curve." Appl. Environ. Microbiol. **56**(6): 1875-1881.