

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
AQUICULTURA**

Herculano Cella

**INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA PRODUÇÃO DE
PIGMENTOS E NA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DA
BIOSSÍNTESE DO ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO NA
MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum***

Florianópolis
2016

Herculano Cella

**INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA PRODUÇÃO
DE PIGMENTOS E NA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DA
BIOSSÍNTESE DO ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO NA
MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado ao Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientador: Roberto Bianchini Derner, Dr.

Florianópolis
2016

Herculano Cella

**INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA PRODUÇÃO DE
PIGMENTOS E NA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DA
BIOSSÍNTESE DO ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO NA
MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de **Bacharel em Engenharia de Aquicultura**, e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 29 de novembro de 2016.

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Orientador

Banca Examinadora:

Biol. Rafael Garcia Lopes, M. Sc.
Universidade Federal de Santa Catarina

Biol. Jacó Joaquim Mattos, M. Sc.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado
aos meus maiores amores: Paulo,
Karim, Camila e Simone.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, pelo exemplo de vida, pela presença, incentivo, carinho e apoio incondicional.

À minha namorada Camila Lisarb, pelo apoio nas horas difíceis e por me fazer acreditar que sou capaz, por me aguentar nos dias estressantes, principalmente quando a palavra “TCC” é dita repetidamente durante dias e noites. Pelos momentos de alegria que fez questão de dividir comigo e por existir na minha vida. Te amo muito!

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Centro de Ciência Agrárias (CCA) e ao Departamento de Aquicultura (AQI) pela possibilidade de realização do Curso de Engenharia de Aquicultura.

Ao professor Roberto Bianchini Derner pela orientação e confiança, pelas oportunidades, pelo apoio e pelo convívio.

Ao meu co-orientador, Rafael Garcia Lopes, pelos ensinamentos, conselhos e por estar sempre pronto a ajudar.

Ao Jacó Joaquim Mattos e ao Rafael Garcia Lopes pela participação e contribuição como membros da banca deste trabalho.

Ao Laboratório de Cultivo de Algas, o qual considero a minha segunda casa, onde tive a oportunidade de adquirir novas experiências e conhecimento, sendo fundamental para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo, sugestões e amizade, em especial ao Henrique, que me ajudou em todos os momentos em que precisei.

Aos meus amigos, Gustavo, Alexandre, Lucas, Daniel e Iryo, pelas risadas, festas, conselhos e pela parceria. “Dale Baby Aqua”!

Ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) pela possibilidade de desenvolver as análises deste trabalho.

À Daína, pela amizade e pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica no Projeto de Pesquisa “Produção de biomassa de microalgas em escala piloto para a obtenção de biodiesel”

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são essenciais para a alimentação e saúde animal, especialmente o ácido eicosapentaenoico (EPA) com potenciais aplicações nutraceuticas e farmacêuticas. A única fonte atualmente disponível de EPA é o óleo de peixe, entretanto a possível contaminação deste ácido graxo no ambiente marinho, torna-se uma preocupação para a nutrição humana. Neste caso, as microalgas são candidatos interessantes para a produção deste composto. A diatomácea *Phaeodactylum tricornerutum* acumula EPA naturalmente. Apesar desta microalga possuir o genoma sequenciado, ainda há um conhecimento limitado em relação aos mecanismos moleculares e a regulação da transcrição gênica no metabolismo dos ácidos graxos. As microalgas alteram o teor dos pigmentos fotossintetizantes em resposta às alterações na intensidade de luz a fim de otimizar a fotossíntese. O metabolismo celular pode ser alterado tanto por fatores relacionados ao tempo de exposição a luz, quanto por mecanismos endógenos. O efeito das condições ambientais na transcrição dos genes da biossíntese do EPA ainda é um assunto inexplorado. Portanto, neste trabalho foi avaliado a possível correlação entre diferentes fotoperíodos (12:12, 16:8 e 24:0) no perfil dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, clorofila *c*, fucoxantina, diadinoxantina e β -caroteno) e no perfil de transcrição dos genes *PTD6*, *PTD15*, *ELOb1*, *ELOb2*, *PTD5* alfa e *PTD5* beta em específicos intervalos de tempo. As culturas foram aclimatadas durante sete dias utilizando o meio f/2 de Guillard modificado. Após a aclimação, o experimento foi realizado em 26 horas, sendo que as coletas foram feitas em diferentes intervalos de tempo. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *c* e fucoxantina foram maiores nos fotoperíodos 12:12 e 16:8 durante o período claro e menores durante o período escuro. Cada fotoperíodo apresentou um perfil distinto na concentração de pigmentos e na expressão dos genes da biossíntese de EPA. O fotoperíodo influencia nos níveis de transcritos dos genes dessa via metabólica, assim como no acúmulo de pigmentos.

Palavras-chave: EPA, *Phaeodactylum tricornerutum*, biossíntese, fotossíntese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de PUFAs n-3 e n-6. Adaptado de Gil e Valivety (1997) e López-Vacario et al. (2016).....	19
Figura 2. Possíveis vias de síntese de EPA em <i>P. tricornutum</i> . Adaptado de Arao e Yamada (1994).....	23
Figura 3. Modelo simplificado do sistema circadiano. Adaptado de Mittag (2001).....	25
Figura 4. Cepa da diatomácea <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP1055/1.....	29
Figura 5. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> no período de aclimação.....	30
Figura 6. Período de iluminação dos três tratamentos nos respectivos intervalos de tempo.....	31
Figura 7. Amostras de <i>P. tricornutum</i> para análise de clorofila e carotenoides.....	32
Figura 8. Metodologia para estimar a concentração de carotenoides em <i>P. tricornutum</i>	33
Figura 9. Amostras de cDNA utilizadas nas reações de qPCR...	36
Figura 10. Real-Time Cycler Rotor Gene (A) e Rotor Gene 6000 Series software (B).	36
Figura 11. Concentração de pigmentos em <i>P. tricornutum</i> submetidos ao fotoperíodo 12:12.	41
Figura 12. Concentração de pigmentos em <i>P. tricornutum</i> submetidos ao fotoperíodo 16:8.	42
Figura 13. Concentração de pigmentos em <i>P. tricornutum</i> submetidos ao fotoperíodo 24:0.	44
Figura 14. Perfil de transcrição dos genes em <i>P. tricornutum</i> submetidos ao fotoperíodo 12:12.	46
Figura 15. Perfil de transcrição dos genes em <i>P. tricornutum</i> submetidos ao fotoperíodo 16:8.	47
Figura 16. Perfil de transcrição dos genes em <i>P. tricornutum</i> submetidos ao fotoperíodo 24:0.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do Meio f/2 de Guillard (1975) modificado no LCA/UFSC, empregado nas culturas de microalgas marinhas.	30
Tabela 2. Preparação do Mix de transcrição reversa.....	34
Tabela 3. Preparação do Mix para a reação de eliminação do DNA genômico.....	34
Tabela 4. Lista dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR. Identificação dos genes, iniciadores, sequências, tamanho dos amplicons e códigos de acesso do NCBI (NCBI GENBANK, http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).....	35

SUMÁRIO

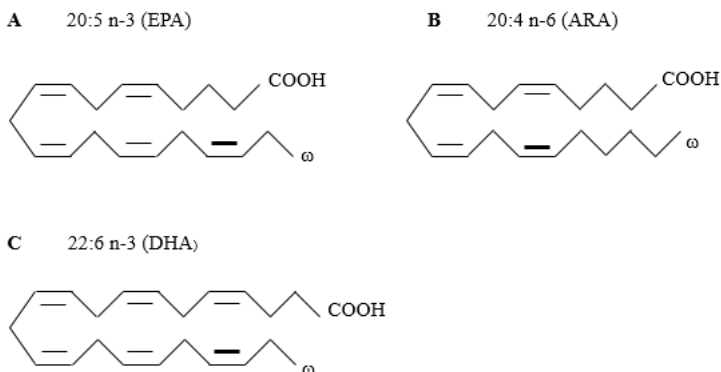
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa.....	19
1.2 Importância e Fontes de EPA	20
1.3 Diatomáceas e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	21
1.4 Biossíntese de EPA.....	22
1.5 Influência do ciclo claro/escuro nas microalgas	24
2 OBJETIVO GERAL	27
2.1 Objetivos Específicos	27
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 Condições de cultivo	29
3.2 Determinação dos Pigmentos Fotossintetizantes	32
3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA	33
3.4 Condições/Análises da qPCR	34
3.5 Níveis de transcrição/expressão relativa dos genes	37
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Teor de Pigmentos.....	41
5.2 Perfil de Transcrição.....	45
6 CONCLUSÕES.....	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são formados por hidrocarbonetos de cadeias longas que possuem duas ou mais insaturações. As duas principais famílias de PUFAs com atividades biologicamente ativas (Figura 1) distinguem-se pela distância da última dupla ligação no metil final de sua cadeia carbônica: PUFAs ômega-3 (ω -3 ou n-3), que corresponde a um grupo cuja última dupla ligação está localizada a três carbonos do ômega, e PUFAs ômega-6 (ω -6 ou n-6), a seis carbonos do ômega (MEDINA et al., 1998; KHOZIN-GOLDBERG; ISKANDAROV, 2011).

Figura 1. Exemplos de PUFAs n-3 e n-6. Adaptado de Gil e Valivety (1997) e López-Vacario et al. (2016).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Ácido Eicosapentaenoico (**A**, EPA), Ácido Araquidônico (**B**, ARA) e Ácido Docosahexaenoico (**C**, DHA). O carbono ômega está representado por ω , enquanto a última ligação da cadeia está em negro.

Dentre os principais PUFAs para a nutrição animal, estão o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) são os compostos bioativos mais importantes. Uma ingestão dietética adequada de PUFAs exerce altos benefícios de saúde. A ingestão desequilibrada de PUFAs n-3 e n-6 ou a absorção insuficiente de n-3 altera a proporção n-6/n-3 que está associada a ocorrência de doenças cardíacas (SIMOPOULOS, 1991).

As funções biológicas dos PUFAs estão relacionadas as suas características estruturais. Por exemplo, a regulação da permeabilidade das membranas está relacionada com a maior quantidade de ácidos graxos insaturados. O ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6) e EPA (20:5 n-3) são precursores de eicosanoides, mediadores inflamatórios de origem lipídica. A quantidade de insaturações do EPA faz ele um eicosanoide anti-inflamatório (prostaglandinas) e o ARA é um eicosanoide pró-inflamatório (leucotrienos). Estes exercem um controle em diversos processos fisiológicos e bioquímicos, especialmente na inflamação, imunidade e como mensageiros do sistema nervoso central (GIL; VALIVETY, 1997; CERTIK; SHIMIZU, 1998; PATIL et al., 2005; WARD; SINGH, 2005; KHOZIN-GOLDBERG; ISKANDAROV, 2011).

Conforme Valentine e Valentine (2004), as células são capazes de escolher entre uma hierarquia de cadeias ou estruturas de fosfolipídeos adequados para a manutenção da fluidez das membranas em diferentes ambientes ou para suas necessidades bioquímicas.

Com relação às membranas biológicas, sua função estrutural é de extrema importância funcional. Em microalgas marinhas de águas temperadas, o estresse pela temperatura baixa provoca o aumento do teor de PUFAs para manter a fluidez da membrana (RICHMOND, 1986; SRIRANGAN et al., 2015).

1.2 Importância e Fontes de EPA

O EPA destaca-se por ser essencial em dietas balanceadas para humanos, já que não é sintetizado naturalmente. O EPA é muito utilizado devido as suas potenciais aplicações farmacêuticas e nutraceuticas (alimentos ou produtos nutricionais com atividade biológica atribuída à saúde), sendo benéfico nos tratamentos de algumas doenças cardíacas e contra o câncer (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998; SIMOPOULOS, 2008).

A única fonte atualmente disponível em escala comercial de EPA é o óleo de peixe. Sua quantidade vem decrescendo nos últimos anos devido a redução dos estoques pesqueiros, enquanto a demanda por este ácido graxo tende a aumentar. A exploração excessiva desses recursos pesqueiros leva a consequências ambientais graves a fim de atender um mercado de alimentação em expansão (BELARBI et al., 1999).

A presença de contaminantes como pesticidas, metais pesados, metais traço e alguns tipos de inseticidas no óleo de peixe como fonte de EPA é um potencial problema para nutrição humana (KHOZIN-GOLDBERG; ISKANDAROV, 2011; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2014).

O cultivo de microalgas marinhas para a produção de PUFAs n-3 é uma alternativa interessante, pois são produtores primários na cadeia trófica. Muito utilizadas como alimentação na aquicultura, apresentam importante valor nutricional devido à sua capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades de PUFAs n-3. Apesar do óleo de peixe ser a fonte mais rica em EPA, acredita-se que este óleo é derivado das microalgas, as quais são consumidas via cadeia alimentar (BELARBI et al., 1999; PATIL et al., 2005; PATIL et al., 2007).

1.3 Diatomáceas e *Phaeodactylum tricornutum*

As diatomáceas (Bacillariophyceae) são microorganismos fotossintéticos encontrados em ambientes marinhos e dulcícolas de baixa temperatura e são responsáveis por 20% da produtividade primária global. Possuem parede celular composta por uma frústula de silício, a qual apresenta diversas nanoestruturas ornamentais que variam de acordo com as espécies (LOPEZ et al., 2005).

De acordo com Parkinson e Gordon (1999), além de sua importância ecológica, estudos recentes estão sendo feitos com diatomáceas por serem uma fonte em potencial na área de nanotecnologia cujas aplicações envolvem a microfabricação de nanotubos para a produção da fibra ótica e, posteriormente ser utilizada em tele-comunicações. São consideradas fontes promissoras de compostos de interesse, os quais possuem várias aplicações biotecnológicas, sendo empregadas na área alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (LEBEAU; ROBERT, 2003).

Neste grupo, destaca-se a diatomácea penada marinha *Phaeodactylum tricornutum*, a qual é reconhecida como um organismo-modelo para estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos (DE MARTINO et al., 2007; BOWLER et al., 2008).

P. tricornutum é um candidato interessante para a produção de compostos naturais (PUFAs e carotenoides) cujas aplicações envolvem dietas para os cultivos na área aquícola, corantes naturais, assim como pela capacidade de prevenir doenças devido as suas propriedades terapêuticas (REIS et al., 1996; GILL;

VALIVETY, 1997; BAKER; GÜNTHER, 2004; LOPEZ et al., 2005; KUCZYNSKA et al., 2015).

Esta microalga apresenta altos teores de PUFAs n-3, especialmente o EPA que é acumulado naturalmente e corresponde com aproximadamente 20 a 40% dos ácidos graxos totais, sendo de grande importância para a alimentação na aquicultura (WEN & CHEN, 2003; PATIL et al., 2005; FAJARDO et al., 2007).

1.4 Biossíntese de EPA

A biossíntese de EPA em *P. tricornutum* foi primeiramente descrita por Arao e Yamada (1994) através de estudos a partir de marcação com rádio-isótopos (C_{14}) e dados de cromatografia gasosa, oportunidade em que foram demonstradas quatro possíveis rotas de produção desse ácido graxo (Figura 2) a partir do ácido oleico (C18:1). Dentre estas, a mais ativa (Figura 2, em negrito) envolve quatro reações de insaturação e uma reação de alongação da cadeia carbônica. Essa rota biossintética envolve ácidos graxos da família n-6 como o ácido linoleico (LA) e o ácido gama-linolênico (GLA) e da família n-3 como o ácido estearidônico (SDA) e o ácido eicosatetraenoico (ETA), até finalmente chegar ao EPA.

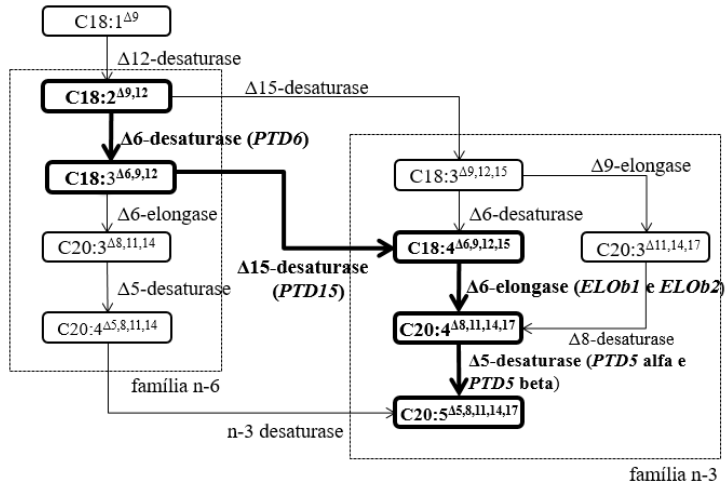
De acordo com Domergue et al. (2002), *P. tricornutum* é um organismo-modelo particularmente interessante para estudos em relação a biossíntese de PUFAs, já que o EPA pode apresentar entorno de 30% dos ácidos graxos totais dessa diatomácea considerando que todos os intermediários dessa rota metabólica são encontrados em pequena quantidade. Esta acumulação de apenas EPA pode indicar que as desaturases e elongases presentes nesta biossíntese são muito eficazes em canalizar os diferentes intermediários até o produto final.

Na presença de oxigênio, as desaturases podem saturar os ácidos graxos em ácidos graxos insaturados ao inserir uma nova dupla ligação entre as moléculas de carbono. As elongases são consideradas complexos multi-enzimáticos capazes de adicionar duas unidades de carbono à cadeia dos PUFAs (MÜHLROTH et al., 2013; DOLCH; MARÉCHAL, 2015).

Para aumentar o conteúdo lipídico de PUFAs n-3, os fatores ambientais são muito utilizados, porém em muitos casos os mecanismos por trás dessa plasticidade fisiológica, incluindo a regulação da transcrição gênica das desaturases e elongases envolvidas na biossíntese do EPA, não são compreendidas. As

informações obtidas em nível molecular, permitem a adaptação das algas, por meio da criação seletiva, engenharia genética e estudos fisiológicos, como possíveis produtores de ácidos graxos em uma escala mais ampla (ARAO; YAMADA, 1994; CHAUTON et al., 2013; MÜLROTH et al., 2013).

Figura 2. Possíveis vias de síntese de EPA em *P. tricornutum*. Adaptado de Arao e Yamada (1994).



Linhas em negrito indicam a rota mais ativa com os respectivos genes. Ácidos graxos n-9: ácido oleico (C18:1^{Δ9}). Ácidos graxos n-6: ácido linoleico (C18:2^{Δ9,12}); ácido γ -linolênico (C18:3^{Δ6,9,12}); ácido di-homo- γ -linolênico (C20:3^{Δ8,11,14}); ácido araquidônico (C20:4^{Δ5,8,11,14}). Ácidos graxos n-3: ácido α -linolênico (C18:3^{Δ9,12,15}); ácido estearidônico (C18:4^{Δ6,9,12,15}); ácido eicosatrienoico (C20:3^{Δ11,14,17}); ácido eicosatetraenoico (C20:4^{Δ8,11,14,17}); ácido eicosapentaenoico (C20:5^{Δ5,8,11,14,17}).

A conclusão do sequenciamento do genoma dessa microalga possibilita outras estratégias para o conhecimento de sua fisiologia, gerando uma compreensão mais aprofundada de alguns fatores que regulam importantes processos celulares em diatomáceas (BOWLER et al., 2008).

Apesar da sua abundância nos oceanos, os mecanismos moleculares relacionados ao sucesso das diatomáceas ainda são inexplorados. Ferramentas moleculares, como a transformação

genética são necessárias para estudos com genômica funcional. A recente disponibilidade de sequências do genoma oferece novas oportunidades para estudos sobre a expressão gênica em *P. tricornutum* (SIAUT et al., 2007).

Neste cenário, a engenharia genética, juntamente com o mapeamento e a identificação de regiões do genoma que codifica a proteína de microalgas, é um campo em rápido desenvolvimento que pode fornecer ferramentas mais específicas, como a manipulação do tamanho da cadeia carbônica de ácidos graxos e o aumento da síntese de lipídeos em *P. tricornutum* (RADAKOVITS et al., 2010; XUE et al., 2015).

Além de estudos sobre a engenharia genética com *P. tricornutum*, a expressão dos genes também é influenciada por fatores externos. No ambiente, as microalgas dependem de mecanismos de regulação fisiológica codificados no genoma que são induzidos frente a determinadas condições de cultivo, como mudanças recorrentes em condições de nutrientes, pH e ao fotoperíodo (ASHWORTH et al., 2013; CHAUTON et al., 2013).

1.5 Influência do ciclo claro/escuro nas microalgas

A microalga *Phaeodactylum tricornutum* responde a variações na intensidade de luz modificando o teor de pigmentos fotossintetizantes, entre eles as clorofilas (*a* e *c*) e os carotenoides (fucoxantina, diadinoxantina e β -caroteno). Essas mudanças na pigmentação conduzem a alterações nas respostas fotossintéticas e na taxa de crescimento (RAGNI; D'ALCALÀ, 2007; NIKOLAOU et al., 2016).

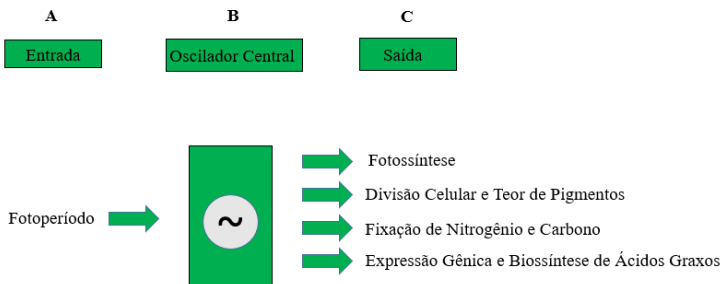
Quando a disponibilidade da intensidade luminosa é aumentada ou reduzida, este organismo pode apresentar diferentes mecanismos e estratégias para otimizar a taxa fotossintética. A fotoaclimação é um processo em que as microalgas modificam o conteúdo celular da clorofila e dos pigmentos fotossintetizantes para otimizar a fotossíntese (OWENS et al. 1980; ANNING et al., 2000).

Quando há pouca luz, as microalgas tendem a aumentar a área de captação de luz de maneira mais eficiente possível e, quando a intensidade de luz se torna supersaturada, é necessário proteger o organismo de um potencial dano foto-oxidativo (RAGNI; D'ALCALÀ, 2007; NYMARK et al., 2013).

No ambiente natural, a oscilação das correntes submete as microalgas a maiores variações nas condições de luz, principalmente em processos foto-dependentes, como a fixação do carbono, biossíntese de ácidos graxos, teor de pigmentos e divisão celular (OWENS et al., 1980; KLEIN; SOURNIA, 1987; BRUYANT et al., 2005; RAGNI; D'ALCALÀ, 2007; CHAUTON et al., 2013).

Em ambientes controlados, onde as variações naturais da irradiância no oceano podem ser simuladas através do ciclo claro/escuro, é possível expressar ritmos circadianos gerados a partir de oscilações contínuas (TAKAHASHI, 1991; BRUYANT et al., 2005; MÁŠ; YANOVSKY, 2009) de acordo com a Figura 3.

Figura 3. Modelo simplificado do sistema circadiano. Adaptado de Mittag (2001).



A via de entrada (A) leva informações sobre a quantidade e qualidade da luz até o oscilador central (B) onde se encontra o mecanismo gerador de ritmos. Em seguida, este precursor transfere a informação para a via de saída (C).

A ritmicidade circadiana é uma característica fundamental para a maioria dos organismos e, geralmente é influenciada por condições ambientais como a luz (OWENS et al., 1980) e temperatura (DUNLAP, 1999), as quais são responsáveis pela sincronização do relógio circadiano em níveis moleculares (TAKAHASHI, 1991; MITTAG, 2001).

Essa alternância entre o período claro e o escuro induz modificações nos processos metabólicos das células, como um melhor equilíbrio entre a absorção da luz e sua utilização,

resultando na mudança de sua composição bioquímica (CARON et al. 1988).

De acordo com CHAUTON et al. (2013), o metabolismo celular ocorre em padrões cíclicos e pode ser induzido por fatores externos como ciclos claro/escuro e por fatores internos, tais como relógios biológicos. Estes estão relacionados com a transcrição gênica de maneira que os genes envolvidos são influenciados pelo tempo de exposição à luz e pelos ritmos circadianos.

Apesar da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* possuir o genoma sequenciado, ainda há um conhecimento limitado sobre os mecanismos moleculares e a regulação da transcrição gênica da biossíntese do ácido eicosapentaenoico (EPA) frente a um contexto ecofisiológico. Uma vez que este ácido graxo é encontrado nas membranas tilacóides, local onde ocorre a fase fotoquímica da fotossíntese, é possível que exista uma relação entre a transcrição dos genes dessa via e o regime de iluminação. Procura-se então entender melhor a biossíntese deste ácido graxo, permitindo um melhor conhecimento da produção de EPA por essa diatomácea em um contexto ambiental.

2 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito dos diferentes fotoperíodos na produção de pigmentos e no perfil de transcrição gênica da biossíntese do ácido eicosapentaenoico na microalga *Phaeodactylum tricornerutum*.

2.1 Objetivos Específicos

Determinar o perfil dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, clorofila *c*, fucoxantina, diadinoxantina e β -caroteno) em diferentes fotoperíodos e em específicos intervalos de tempo;

Avaliar o perfil de transcrição dos genes $\Delta 6$ -desaturase (*PTD6*), $\Delta 15$ -desaturase (*PTD15*), $\Delta 6$ -elongase (*ELOb1* e *ELOb2*), $\Delta 5$ -desaturase (*PTD5* alfa e *PTD5* beta) em diferentes fotoperíodos e em específicos intervalos de tempo.

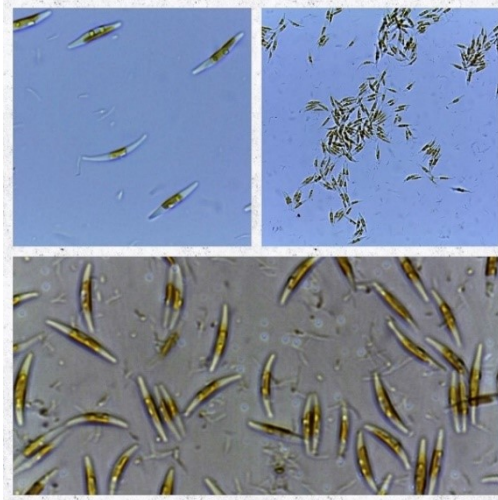
3 METODOLOGIA

3.1 Condições de cultivo

A cepa da diatomácea *Phaeodactylum tricorutum* CCAP1055/1 (Figura 4) está mantida no banco de cepas do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da Universidade Federal de Santa Catarina em meio f/2 de acordo com Guillard (1975) modificado (Tabela 1) com adição de 80 mg L⁻¹ de silicato de sódio, em frascos de 100 mL, armazenada em câmara de germinação com fotoperíodo 8:16 a temperatura de 20 °C.

O experimento foi desenvolvido empregando três tratamentos: fotoperíodos de 12:12, 16:8 e 24:0, com quatro réplicas. As culturas foram aclimatadas (Figura 5) durante sete dias com diluição diária a fim de manter a biomassa em 150 mg L⁻¹ para evitar o autossombreamento e desenvolvidas em frascos de borossilicato contendo 1 L de meio f/2 com adição de 80 mg L⁻¹ de silicato de sódio, numa irradiância de 170 μmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 22 ± 0,5 °C e agitação da cultura feita através do borbulhamento do ar atmosférico com adição de 0,5% de CO₂ (v/v).

Figura 4. Cepa da diatomácea *Phaeodactylum tricorutum* CCAP1055/1.

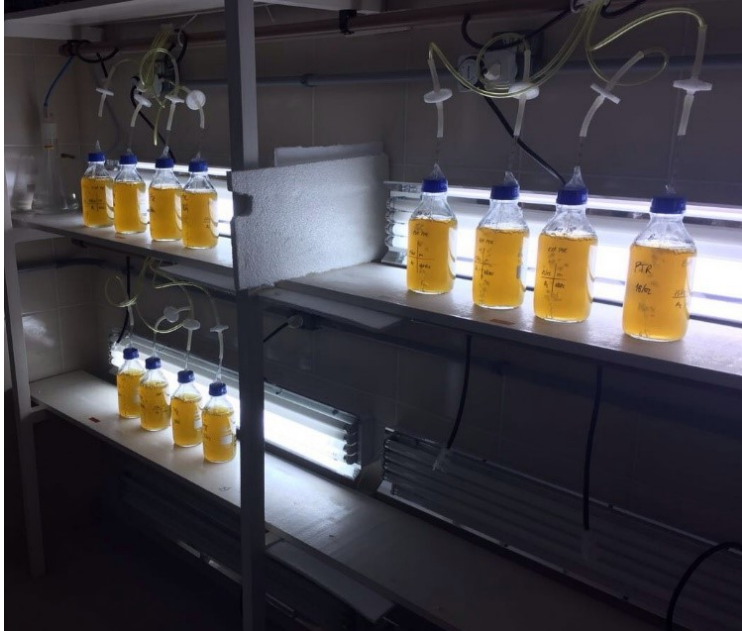


Fonte: Laboratório de Cultivo de Algas (LCA)

Tabela 1. Composição do Meio f/2 de Guillard (1975) modificado no LCA/UFSC, empregado nas culturas de microalgas marinhas.

Soluções	
1. Solução de Nitrato	
NaNO ₃ -----	150,0 g
FeCl ₃ .6H ₂ O -----	8,0 g
EDTA Na ₂ -----	10,0 g
Sol. Metais Traço -----	2,0 mL (de cada solução)
Água destilada -----	1,0 L
Adicionar 1,0 mL para cada litro de água do mar.	
1.1 Solução de Metais Traço	
ZnCl ₂ .7H ₂ O -----	1,65 g
CoCl ₂ .6H ₂ O -----	1,50 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O -----	0,60 g
CuSO ₄ .5H ₂ O -----	1,47 g
MnCl ₂ .6H ₂ O -----	27,0 g
Água destilada para cada solução -----	150,0 mL
2. Solução de Fosfato	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O -----	16,0 g
Solução de Biotina -----	1,0 mL
Solução de Cianocobalamina -----	1,0 mL
Tiamina -----	0,2 g
Água destilada -----	1,0 L
Adicionar 1,0 mL para cada litro de água do mar.	
2.1 Solução de Biotina	
Biotina -----	0,125 g
Água destilada -----	125 mL
2.2 Solução de Cianocobalamina	
Cianocobalamina -----	0,125 g
Água destilada -----	125 mL
3. Solução de Silicato (somente para cultivo de diatomáceas)	
Silicato de Sódio Comercial (H-300, QUIMIDRO) -----	80,0 g
Água destilada -----	1,0 L
Adicionar 1,0 mL para cada litro de água do mar.	

Figura 5. *Phaeodactylum tricornutum* no período de aclimação.



Fonte: Herculano Cella (2016)

Após a aclimação, o experimento foi realizado em 26 horas, sendo as amostras coletadas em diferentes intervalos de tempo (T0; T6; T10; T14; T18; T22 e T26) de acordo com a Figura 6. Foi feito também a atenuação da luz, medindo a irradiância no começo, no meio e no final dos frascos antes e depois da diluição. Com o dobro da biomassa, teve-se apenas uma diferença de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou seja, 90% da luz passou pelos frascos.

Figura 6. Período de iluminação dos três tratamentos nos respectivos intervalos de tempo.

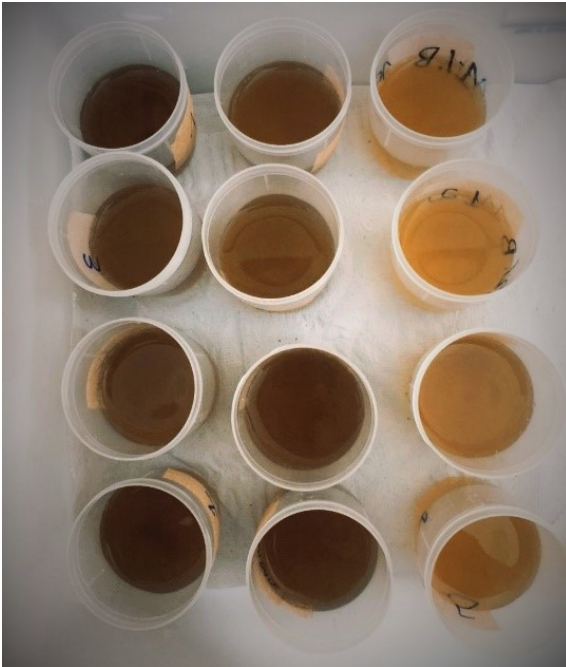
Fotoperíodo/Tempo	T0	T6	T10	T14	T18	T22	T26	
12:12	Claro	Claro	Claro	Escuro	Escuro	Escuro	Claro	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: yellow; margin-right: 5px;"></div> Claro <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: black; margin-left: 20px; margin-right: 5px;"></div> Escuro </div>
16:8	Claro	Claro	Claro	Claro	Escuro	Escuro	Claro	
24:0	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

3.2 Determinação dos Pigmentos Fotossintetizantes

As amostras (10 mL) (Figura 7) foram coletadas de cada unidade experimental nos diferentes intervalos de tempo de cada fotoperíodo, filtradas com microfiltro de fibra de vidro GF-1 (Macherey-Nagel) e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise. Os pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, clorofila *c*, fucoxantina, diadinoxantina e β -caroteno) foram extraídos com acetona 90% (Quimex) e quantificados em espectrofotômetro (Thermo Scientific) nos comprimentos de onda 664, 630 e 480 nm (STRICKLAND; PARSONS, 1972). Para calcular a concentração de clorofila e dos carotenoides foi utilizada a metodologia de Strickland e Parsons (1972) e Carreto e Catoggio (1977) respectivamente de acordo com a Figura 8. As concentrações dos pigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) foram normalizadas pela biomassa (g L^{-1}) para obter a concentração final dos pigmentos (mg g^{-1}).

Figura 7. Amostras de *P. tricornutum* para análise de clorofila e carotenoides.



Fonte: Herculano Cella (2016)

Figura 8. Metodologia para estimar a concentração de carotenoides em *P. tricornutum*.

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 11,47 \times A_{664} - 0,40 \times A_{630}$$

$$\text{Clorofila } c \text{ (}c_1+c_2\text{) (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 24,36 \times A_{630} - 3,73 \times A_{664}$$

$$\text{Fucoxantina (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (99,50 - 23,99 \times A_{480(t)}/A_{664(t)}) \times 10^{-2} \times A_{480(tc)} \times 13,79$$

$$\text{Diadinoxantina (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (-1,98 + 19,24 \times A_{480(t)}/A_{664(t)}) \times 10^{-2} \times A_{480(tc)} \times 4,00$$

$$\beta\text{-Caroteno (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (7,97 + 0,45 \times A_{480(t)}/A_{664(t)}) \times 10^{-2} \times A_{480(tc)} \times 4,47$$

Onde:

A = absorvância;

t = total;

tc = total corrigido.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA

As amostras (50 mL) foram coletadas de acordo com SIAUT et al. (2007) de cada unidade experimental nos diferentes intervalos de tempo de cada fotoperíodo e centrifugadas a 3500 rpm durante 5 minutos, lavadas uma vez com água do mar estéril, com o pellet imediatamente congelado em nitrogênio líquido e depois, em seguida, armazenado a -80 °C. O RNA total foi extraído a partir de 10^8 células utilizando 1 mL de Qiazol Lysis Reagent (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração foi estimada em 260 nm, com a pureza sendo verificada nas relações 260/280 (>1.8) e 260/230, no Nanodrop 1000 (Thermo).

Em seguida, o cDNA foi sintetizado com o QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 2). Antes da transcrição reversa, 1 μg do RNA total foi tratado com o gDNA Wipeout Buffer fornecido pelo mesmo kit por 2 minutos a 42 °C para eliminar a contaminação do gDNA (DNA genômico) (Tabela 3). Após o procedimento, a concentração do cDNA e sua pureza foram verificadas no Nanodrop, como descrito anteriormente.

Tabela 2. Preparação do Mix de transcrição reversa.

Componente	Volume por reação	Concentração final
QuantiTect Reverse Transcriptase	1 μ L	
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 μ L	1x
RT Primer Mix	1 μ L	
Volume total final	6 μL	

Tabela 3. Preparação do Mix para a reação de eliminação do DNA genômico.

Componente	Volume por reação	Concentração final
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 μ L	1x
RNA	4 μ L	
Água biomol	8 μ L	
Volume total final	14 μL	

3.4 Condições/Análises da qPCR

Os iniciadores foram desenhados utilizando o software OlygoAnalyzer (IDT. <http://idtdna.com>) baseado nas sequencias de mRNAs (RNA mensageiro) a partir da DiatomCyc database (<http://www.diatomcyc.org>), resultando nos pares de iniciadores listados na Tabela 4. *PTD15*, *ELOb1* e *ELOb2* foram sequências presumidas, enquanto *PTD6*, *PTD5* alfa e *PTD5* beta foram descritas por Domergue et al. (2002).

Tabela 4. Lista dos iniciadores utilizados nas reações de *qPCR*. Identificação dos genes, iniciadores, seqüências, tamanho dos amplicons e códigos de acesso do NCBI (NCBI GENBANK, <http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Gene	Iniciadores	Seqüências	Amplicon (nt)	Referência das Seqüências (NCBI)
<i>PTD15</i> ($\Delta 15$ -Desaturase)	PTD15f	5'-TCGAAGAAGCGACGAAATCC-3'	102	XM_002185462.1
	PTD15r	5'-TGGCAATCTCCTGCGTAAAG-3'		
<i>PTD6</i> ($\Delta 6$ -Desaturase)	PTD6f	5'-ACTACGCTTGGATGCTTACC-3'	114	XM_002182865.1
	PTD6r	5'-AGACAATGGCGAGCAAGAA-3'		
<i>ELO6b1</i> (Elongase $\Delta 6$ b1)	ELO6b1f	5'-GCTATCATGGTCTTGCATAAAGG-3'	120	XM_002182520.1
	ELO6b1r	5'-GAGGTACGAGCTGACAAAGAA-3'		
<i>ELO6b2</i> (Elongase $\Delta 6$ b2)	ELO6b2f	5'-CACACCACCATCTTCTCTTCT-3'	105	XM_002180392.1
	ELO6b2r	5'-GTACATGACGGGTGGATGAA-3'		
<i>PTD5</i> alfa ($\Delta 5$ -Desaturase alfa)	PTD5af	5'-CGGAACCAATGCTCCTATTCA-3'	119	XM_002185696.1
	PTD5ar	5'-GACAGCGGACAACCAAGTATC-3'		
<i>PTD5</i> beta ($\Delta 5$ -Desaturase beta)	PTD5bf	5'-TCGGCCTGGTATCCCTTTAT-3'	131	XM_002182822.1
	PTD5br	5'-CCACCAGTCACGTGCAAATA-3'		
<i>RPS</i> (Ribosomal protein small subunit 30s)	RPSf	5'-CGGCTCTCTTGACATTAGT-3'	110	XM_002178225.1
	RPSr	5'-GACCTTGTGCGTGGATAAT-3'		
<i>H4</i> (Histona)	H4f	5'-ATTGCGTATTCCGTCACCTATAC-3'	108	XM_002179469.1
	H4r	5'-TCCGAAATCCGTAGAGAGTCTT-3'		
<i>TBP</i> (TATA-box binding protein)	TBPf	5'-TCGAAGAAGCGACGAAATCC-3'	102	XM_002186285.1
	TBPr	5'-TGGCAATCTCCTGCGTAAAG-3'		

Em todas as unidades experimentais foram realizadas reações de *qPCR* utilizando 100 ng de cDNA como molde num volume total de reação de 20 μ L. As amostras (Figura 9) foram amplificadas com o QuantiFast® SYBR® Green PCR kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o Real-Time Cycler Rotor Gene Q® (Qiagen) (Figura 10A) e Rotor Gene 6000 Series software (Qiagen) (Figura 10B). As condições dos ciclos foram as seguintes: ativação inicial da *PCR* (95 °C por 5 minutos); desnaturação (95 °C por 10 segundos) e combinação de anelamento/extensão (60 °C por 30 segundos) repetido para os 35 ciclos. Após a fase de amplificação, os fragmentos amplificados foram submetidos a uma curva de fusão (aumentando de 72 °C para 95 \pm 1 °C). Em cada corrida, um controle negativo de transcrição reversa (sem o tratamento para gDNA Wipeout Buffer) foi incluído, assim como um branco de controle em duplicata (água molecular ultrapura). Em todos os controles, não ocorreu amplificação após os 35 ciclos.

Em cada corrida, a eficiência (*E*) da *qPCR* foi verificada para cada par de iniciadores pela construção de uma curva padrão a partir de diluições seriadas (1:1) com 300; 150; 75; 37,5 e 18,75 ng (em duplicata) a partir de um conjunto de todas as amostras de cDNA (84). Somente curvas com eficiências que variam entre 99%

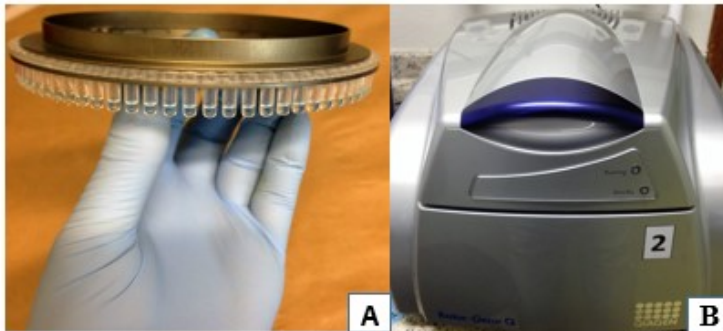
e 101% foram utilizadas e E foi automaticamente calculada pelo Rotor Gene 6000 Series software.

Figura 9. Amostras de cDNA utilizadas nas reações de qPCR.



Fonte: Herculano Cella (2016)

Figura 10. Real-Time Cyler Rotor Gene (A) e Rotor Gene 6000 Series software (B).



Fonte: Herculano Cella.

3.5 Níveis de transcrição/expressão relativa dos genes

Para a normalização dos níveis de transcrição, *RPS* (Ribossomal protein small subunit 30s), *H4* (Histona) e *TBP* (TATA-box binding protein) foram utilizados como genes referência (Tabela 4) de acordo com SIAUT et al. (2007). Para uma análise da expressão relativa mais robusta, aplicando o software geNORM, foi utilizada a média geométrica dos três genes referência (Ref GM). O valor da média ΔCq no intervalo de tempo T0 de cada tratamento para cada gene (n=4) foi adotado como condição de calibração. Os níveis de transcrição relativa dos genes foram calculados para cada tratamento utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde a normalização foi ΔCq (amostra) = Cq (amostra) - Cq (Ref GM), e a calibração foi $\Delta\Delta Cq$ (amostra) = ΔCq (amostra) - ΔCq (média aritmética do grupo T0). Todos os valores de expressão relativa foram apresentados como a razão \log_2 .

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

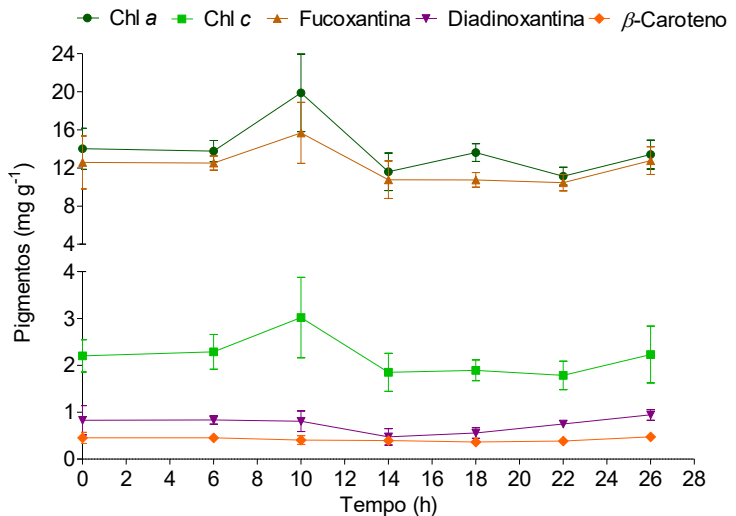
Foi aplicado o software REST 2009 (Qiagen, v2.0.13) para as análises de expressão gênica, utilizando os dados de Cq (n=4) de cada tratamento. Os intervalos de tempo (T6, T10, T14, T18, T22 e T26) foram comparados ao grupo controle (T0 de cada gene, incluindo os três genes referência) com nível de significância de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor de Pigmentos

As concentrações de pigmentos no fotoperíodo 12:12, mostram que o acúmulo de clorofila *a*, clorofila *c* e fucoxantina ocorrem em um mesmo padrão, aumentando a concentração durante o período com luz, chegando a valores máximos de $19,89 \pm 4,07$; $3,02 \pm 0,85$ e $15,68 \pm 3,20$ mg g^{-1} (Figura 11) respectivamente no T10, antes de entrar no período escuro. Durante a fase de obscuridade (T14), houve um decréscimo para fucoxantina com valores em $10,77 \pm 1,97$ mg g^{-1} e clorofila *c* em $1,85 \pm 0,40$ mg g^{-1} , concomitante ocorreu uma leve diminuição para diadinoxantina (Figura 11). O β -caroteno apresentou valores constantes durante as 26 horas e a clorofila *a*, com valores alternados no período escuro. Nota-se que ao final do período escuro, todos os pigmentos tiveram um acréscimo quando voltaram ao período claro (T26).

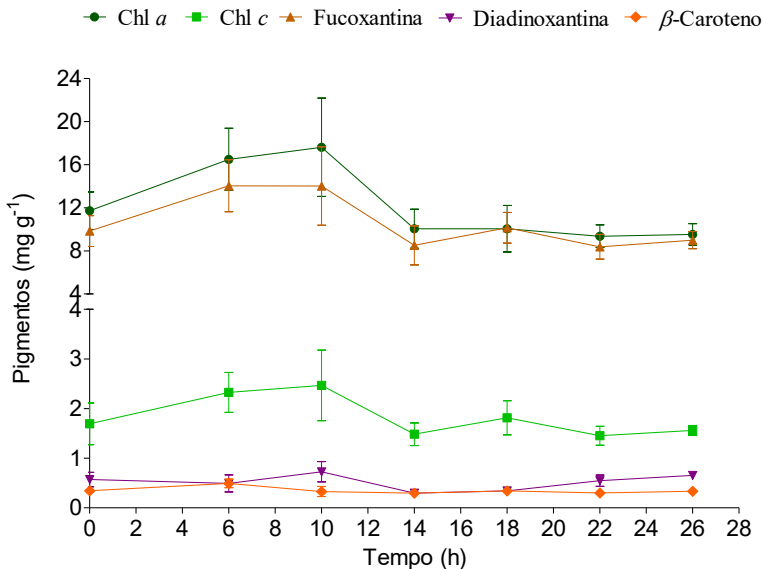
Figura 11. Concentração de pigmentos em *P. tricornutum* submetidos ao fotoperíodo 12:12.



Chl *a*: Clorofila *a*; Chl *c*: Clorofila *c*. Os pontos indicam as médias com o respectivo desvio padrão. O período escuro está entre 12 e 24 h.

No tratamento 16:8 (Figura 12), percebe-se um padrão no acúmulo de pigmentos parecido ao tratamento 12:12 durante o T10 sendo que os valores de clorofila *a*, clorofila *c* e fucoxantina foram de $17,62 \pm 4,56$; $2,46 \pm 0,71$ e $14,01 \pm 3,63$ mg g⁻¹ respectivamente.

Figura 12. Concentração de pigmentos em *P. tricornutum* submetidos ao fotoperíodo 16:8.



Chl *a*: Clorofila *a*; Chl *c*: Clorofila *c*. Os pontos indicam as médias com o respectivo desvio padrão. O período escuro está entre 12 e 24 h.

Conforme Durnford et al. (2010) a captação de luz em microalgas, é realizada a partir dos pigmentos fotossintetizantes, como as clorofilas e os carotenoides. Estes pigmentos estão associados ao fotossistema I e II localizado nas membranas tilacóides do cloroplasto, formando uma antena coletora de luz.

Para Terry et al. (1983) a dependência do período claro/escuro na concentração destes pigmentos está relacionada com a captação de luz no complexo antena. A alternância no acúmulo de pigmentos no período escuro dos fotoperíodos 12:12 e 16:8 provavelmente esteja relacionada a capacidade de as células

armazenarem energia durante o período claro para continuar sintetizando mesmo no período escuro, embora seja severamente reduzido.

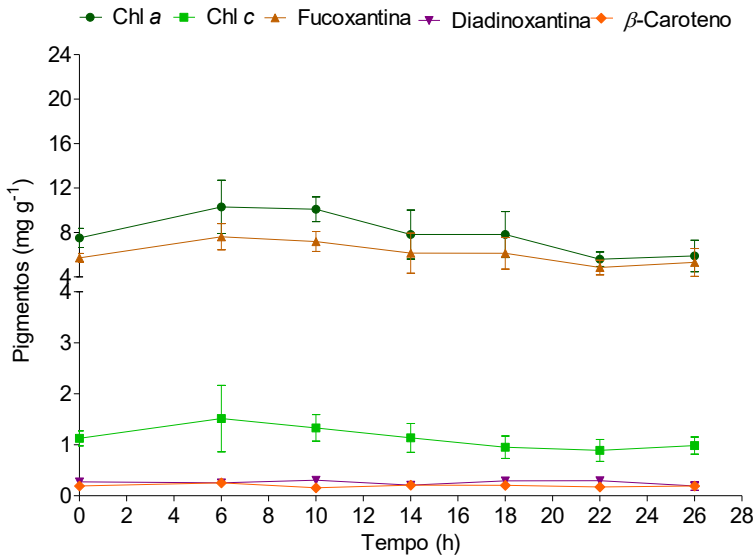
Como a síntese dos pigmentos é regulada principalmente pela luz, Owens et al. (1980) propõe que esta síntese, especialmente a clorofila *a* e clorofila *c*, acontece continuamente no ciclo claro/escuro, porém o acúmulo destes compostos ocorre de forma periódica, ou seja, no período claro.

Caron et al. (1988) e Ragni e D'alcalà (2007) apresentaram resultados similares ao tratamento 12:12. Foi observado que a maior parte dos pigmentos tende a diminuir durante o período escuro e, por isso, as células cultivadas em fotoperíodo de 12:12 parecem estar próximas de uma sincronização.

Na Figura 12, a concentração de clorofila *a*, clorofila *c* e fucoxantina aumenta a partir do T0, enquanto na Figura 11, somente a partir do T6.

No tratamento 24:0 (Figura 13), as concentrações desses pigmentos também aumentam durante as primeiras 6 horas. β -caroteno e diadinoxantina se mantêm constantes durante as 26 horas.

Figura 13. Concentração de pigmentos em *P. tricornutum* submetidos ao fotoperíodo 24:0.



Chl *a*: Clorofila *a*; Chl *c*: Clorofila *c*. Os pontos indicam as médias com o respectivo desvio padrão.

Apesar do acúmulo dos pigmentos durante os tratamentos 12:12 e 16:8 (Figuras 11 e 12) serem similares, nota-se que no fotoperíodo 12:12 a concentração diminuiu antes do período escuro. Era esperado que no tratamento 16:8 as concentrações dos pigmentos também diminuíssem perto do período escuro, porém a diminuição foi semelhante ao fotoperíodo 12:12.

De acordo com Edmunds (1988) foi relatado que as células microalgais respondem a uma sincronização em função do ciclo claro/escuro, sugerindo que estas possuem relógios biológicos que controlam alguns processos celulares. Em um dos experimentos feitos pelo autor, comparando o processo de divisão celular em diferentes regimes de iluminação, algumas espécies de microalgas foram submetidas a um fotoperíodo de 12:12 durante os dois primeiros dias e, em seguida, a um regime de luz contínua durante os próximos três dias. Foi relatado que as células continuaram a se dividir na luz contínua da mesma maneira em que se dividiam quando estavam no período escuro, apesar da divisão celular ocorrer geralmente no período escuro.

Por essa razão, as células que estão aclimatadas ao fotoperíodo 16:8, mesmo estando quatro horas expostas a mais na luz, tendem a apresentar uma possível periodicidade dos ritmos endógenos sincronizadas ao fotoperíodo 12:12.

Para qualquer organismo fotossintético, a luz é um fator extremamente importante que influencia os processos bioquímicos das células. Como as diatomáceas podem crescer em uma ampla gama de intensidades de luz e comprimentos de onda, acredita-se que estes organismos tenham desenvolvido mecanismos específicos de fotoaclimação e fotoadaptação (HUYSMAN et al., 2013).

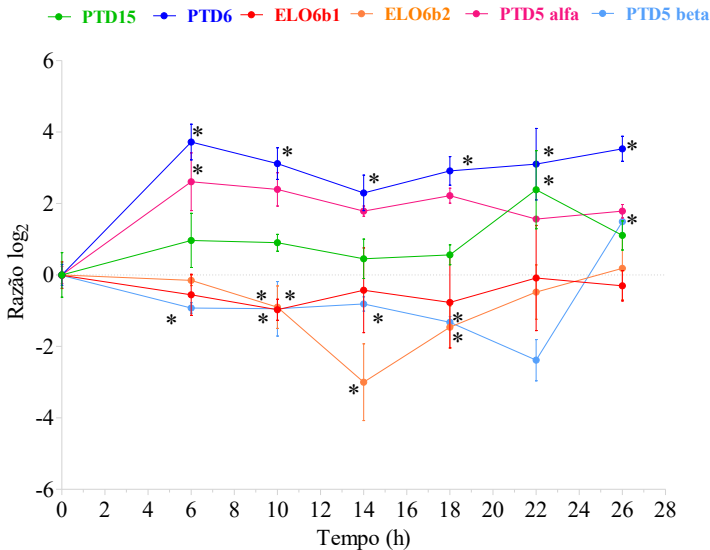
De acordo com Post et al. (1984), o pico nos valores de clorofila e dos demais pigmentos antes do período escuro implica que o metabolismo destes compostos esteja relacionado a um ciclo circadiano endógeno e não simplesmente a presença da luz. Haja visto que no tratamento 24:0 onde o regime de luz é contínuo, as concentrações dos pigmentos permanecem constantes.

Ragni e D'alcalá (2007) consideram que o tratamento com luz contínua é irregular, já que a alternância entre o período claro e o escuro é uma característica de quase todos os ambientes naturais. É possível observar que nos tratamentos 12:12 e 16:8, depois das 24 horas, ainda há uma periodicidade na amplitude na concentração de pigmentos quando expostos novamente à luz, podendo ser um sinal de regulação para o tempo de atividade das células.

5.2 Perfil de Transcrição

Foi observado um perfil de transcrição semelhante para o gene *PTDI5* em todos os tratamentos, no qual este permanece constante em todos os intervalos de tempo com exceção do tratamento 12:12 onde é possível notar um aumento no nível de transcritos durante o período escuro (T22). De acordo com Chauton et al. (2013), aproximadamente 45% dos genes em *P. tricornutum* estão sincronizados com o ciclo claro/escuro. É possível que *PTDI5* não seja regulado pela luz.

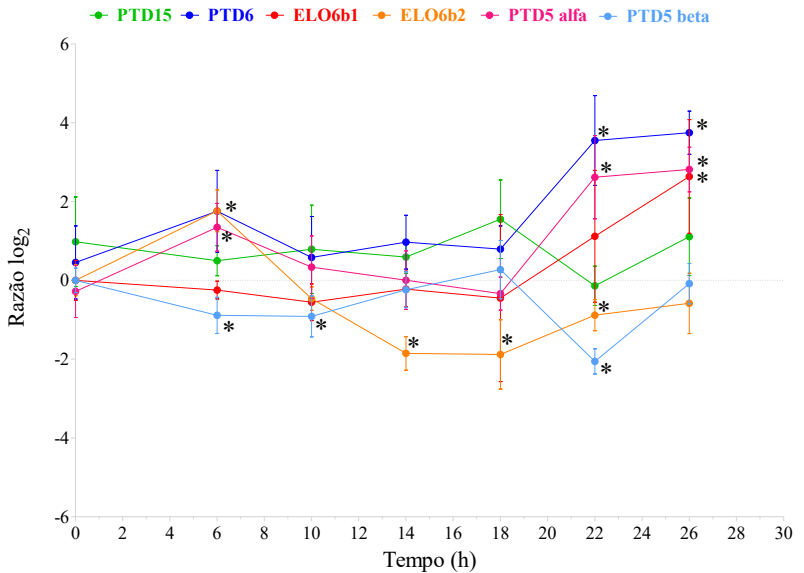
Figura 14. Perfil de transcrição dos genes em *P. tricornutum* submetidos ao fotoperíodo 12:12.



Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao T0 estão indicadas com (*). O período escuro está entre 12 e 24 h.

Por exemplo, os genes *PTD6* e *PTD5* alfa (Figura 14 e 15) alcançam a expressão máxima ($p < 0,05$) no começo do período claro (T6) e expressão mínima no começo do período escuro (T14). Nota-se um aumento no nível de transcritos ($p < 0,05$) durante o período escuro (T22) do tratamento 16:8, onde Chauton et al. (2013) observaram que o período claro parece ser antecipado, à medida que a expressão aumenta durante o período escuro. Todos os tratamentos apresentam um aumento ($p < 0,05$) no nível de transcrição destes genes quando começa novamente o período claro (T26). A expressão destes genes apresentam oscilações na transcrição gênica com picos próximos nas primeiras horas do período claro, indicando que a regulação da expressão gênica pode ser dependente da luz. Estas mudanças podem ser resultado da oscilação nos diferentes níveis de luz e/ou metabólitos ou diretamente causadas por um oscilador circadiano (POLINER et al., 2015).

Figura 15. Perfil de transcrição dos genes em *P. tricornutum* submetidos ao fotoperíodo 16:8.

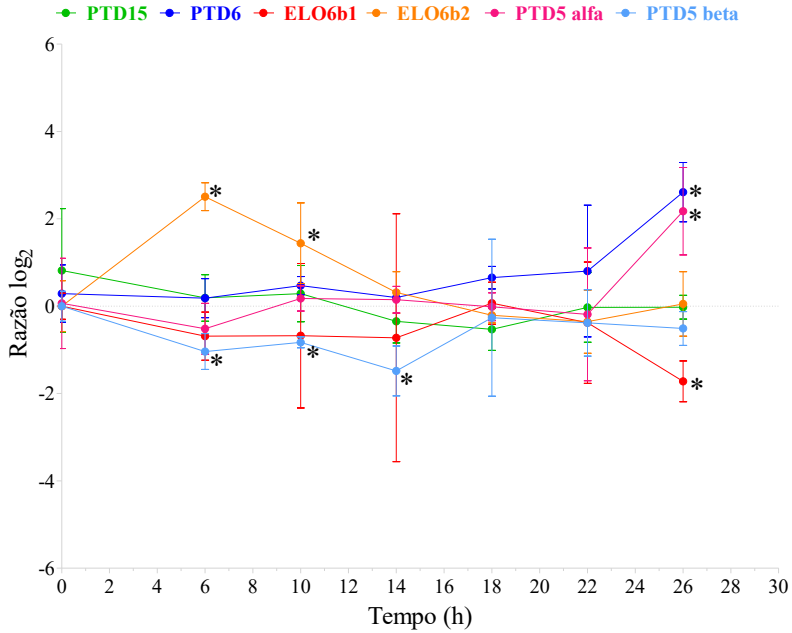


Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao T0 estão indicadas com (*). O período escuro está entre 16 e 24 h.

Em todos os tratamentos, é possível relatar um padrão em relação aos níveis de transcrição dos genes *PTD5* alfa e *PTD5* beta, onde estes aparentam ser divergentes, ou seja, enquanto o gene *PTD5* alfa sobre-expressa, *PTD5* beta subexpressa. O mesmo padrão acontece para os genes *ELOb1* e *ELOb2*. A sincronização das células, como visto anteriormente na síntese dos pigmentos fotossintetizantes, pode afetar a sincronização da expressão gênica sob as condições do fotoperíodo (CHAUTON et al., 2013) de maneira que a célula gaste menos energia e recursos celulares, quando estes genes são transcritos.

Na Figura 16, nota-se que o perfil de transcrição das desaturases são mais constantes no regime de luz contínuo. Isto pode estar relacionado com a maior sensibilidade dos PUFAs à foto-oxidação (DOLCH; MARÉCHAL, 2015).

Figura 16. Perfil de transcrição dos genes em *P. tricornutum* submetidos ao fotoperíodo 24:0.



Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao T0 estão indicadas com (*).

6 CONCLUSÕES

O fotoperíodo influencia nos níveis de transcritos dos genes da biossíntese do ácido eicosapentaenoico, assim como no acúmulo dos pigmentos fotossintetizantes.

A célula tende a gastar menos energia e recursos celulares quando as isoformas dos genes $\Delta 5$ -desaturase (*PTD5* alfa e *PTD5* beta) e $\Delta 6$ -elongase (*ELOb1* e *ELOb2*) são transcritas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNING, T. et al. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Limnol. Oceanogr**, v. 45, n. 8, p. 1807-1817, 2000.

ARAO, T.; YAMADA, M. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. v. 35, n. 5, p. 4-8, 1994.

ASHWORTH, J. et al. Genome-wide diel growth state transitions in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110 VN-, n. 18, p. 7518-7523, 2013.

BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 10, p. 484-488, 2004.

BELARBI, E. H.; MOLINA, E.; CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 951-969, 2000.

BOWLER, C. et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 239-44, 2008.

BRUYANT, F. et al. Diel variations in the photosynthetic parameters of *Prochlorococcus* strain PCC 9511: Combined effects of light and cell cycle. **Limnology and Oceanography**, v. 50, n. 3, p. 850-863, 2005.

CARON, L. et al. Effect of photoperiod on photosynthetic characteristics of two marine diatoms. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, v. 123, n. 3, p. 211-226, 1988.

CARRETO, J.; CATOGGIO, J. An indirect method for the rapid estimation of carotenoid contents in *Phaeodactylum tricorutum*: Possible application to other marine algae. **Marine Biology**, v. 116, n. 320, p. 109-116, 1977.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 1, p. 1-14, 1999.

- CHAUTON, M. S. et al. Gene Regulation of Carbon Fixation, Storage, and Utilization in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum* Acclimated to Light/Dark Cycles. **Plant Physiology**, v. 161, n. 2, p. 1034-1048, 2013.
- DE MARTINO, A. et al. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) accessions. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 5, p. 992-1009, 2007.
- DOLCH, L. J.; MARÉCHAL, E. Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1317-1339, 2015.
- DOMERGUE, F. et al. Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricorutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 16, p. 4105-4113, 2002.
- DUNLAP, J. C. Molecular bases for circadian clocks. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271-290, 1999.
- DURNFORD, D. G. Structure and Regulation of Algal Light-Harvesting Complex Genes. In: RAVEN, J. A.; LARKUM, A. W. D.; DOUGLAS, S. E. **Advances in Photosynthesis and Respiration**. Illinois: Springer Science and Business Media Dordrecht, 2003. v. 14, cap. 4, p. 63-77.
- EDMUNDS, L. N. **Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks**. 1st ed. New York: Springer-Verlag, 1988. p. 1-512.
- FAJARDO, A. R. et al. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 2, p. 120-126, 2007.
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 10, p. 401-409, 1997.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H., eds. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum Press, 1975. p. 26-60.
- HUYSMAN, M. J. J.; VYVERMAN, W.; DE VEYLDER, L. Molecular regulation of the diatom cell cycle. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2573-2584, 2014.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; ISKANDAROV, U.; COHEN, Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: Occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 905-915, 2011.

KLEIN, B.; SOURNIA, A. A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. II. Phytoplankton pigment composition studies by HPLC analysis. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 37, n. 2-3, p. 265-275, 1987.

KUCZYNSKA, P.; JEMIOŁA-RZEMINSKA, M.; STRZALKA, K. Photosynthetic pigments in diatoms. **Marine Drugs**, v. 13, n. 9, p. 5847-5881, 2015.

LEBEAU, T.; ROBERT, J. M. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, p. 624-632, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPEZ, P. J. et al. Prospects in diatom research. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 180-186, 2005.

LOPEZ-VICARIO, C. et al. Pro-resolving mediators produced from EPA and DHA: Overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, p. 133-143, 2016.

MÁS, P.; YANOVSKY, M. J. Time for circadian rhythms: plants get synchronized. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 5, p. 574-579, 2009.

MEDINA, A. R. et al. Downstream Processing of Algal Polyunsaturated Fatty Acids. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 3, p. 517-580, 1998.

MITTAG, M. Circadian Rhythms in Microalgae. In: JEON, K. W.; BOURNE, G. H.; DANIELLI, J. F.; FRIEDLANDER, M.; JARVIK, J., eds. **International Review of Cytology**. Elsevier: Academic Press, 2001. v. 206, cap. 6, p. 213-247.

- MÜHLROTH, A. et al. Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of chromista. **Marine Drugs**, v. 11, n. 11, p. 4662-4697, 2013.
- NIKOLAOU, A. et al. Dynamic coupling of photoacclimation and photoinhibition in a model of microalgae growth. **Journal of Theoretical Biology**, v. 390, p. 61-72, 2016.
- NYMARK, M. et al. Molecular and Photosynthetic Responses to Prolonged Darkness and Subsequent Acclimation to Re-Illumination in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1-19, 2013.
- OWENS, T. G.; FALKOWSKI, P. G.; WHITLEDGE, T. E. Diel periodicity in cellular chlorophyll content in marine diatoms. **Marine Biology**, v. 59, n. 2, p. 71-77, 1980.
- PARKINSON, J.; GORDON, R. Beyond micromachining: The potential of diatoms. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 190-196, 1999.
- PATIL, V. et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. **Aquaculture International**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2007.
- PATIL, V. et al. Microalgae as source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture. **Current Topics in Plant Biology**, v. 6, p. 57-65, 2005.
- PÉREZ-LÓPEZ, P. et al. Environmental evaluation of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricorutum*. **Science of the Total Environment**, v. 466-467, p. 991-1002, 2014.
- POLINER, E. et al. Transcriptional coordination of physiological responses in *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 under light/dark cycles. **Plant Journal**, v. 83, n. 6, p. 1097-1113, 2015.
- RADAKOVITS, R.; EDUAFO, P. M.; POSEWITZ, M. C. Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricorutum*. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 1, p. 89-95, 2011.
- RAGNI, M.; D'ALCALÀ, M. R. Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricorutum*: Pigment content. **Journal of Plankton Research**, v. 29, n. 2, p. 141-156, 2007.

- REIS, A. et al. Eicosapentaenoic acid-rich biomass production by the microalga *Phaeodactylum tricoratum* in a continuous-flow reactor. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 83-88, 1996.
- RICHMOND, A. E. **Microalgaculture**. 1st ed. Critical Reviews in Biotechnology, 1986. v. 4. p. 368-438.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Omega-3 fatty acid concentrates: Nutritional aspects and production technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 230-240, 1998.
- SIAUT, M. et al. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricoratum*. **Gene**, v. 406, n. 1-2, p. 23-35, 2007.
- SIMOPOULOS, A P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **The American journal of clinical nutrition**, v. 54, n. 3, p. 438-63, 1991.
- SRIRANGAN, S. et al. Interaction of temperature and photoperiod increases growth and oil content in the marine microalgae *Dunaliella viridis*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1-32, 2015.
- STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A practical handbook of seawater analysis**. 2.ed. Canada: Fishery Research Board, 1972. p. 1-311.
- TAKAHASHI, J. S. Circadian rhythms: From gene expression to behavior. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 1, n. 4, p. 556-561, 1991.
- TERRY, K. L.; HIRATA, J.; LAWS, E. A. Light-limited growth of two strains of the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* Bohlin: Chemical composition, carbon partitioning and the diel periodicity of physiological processes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 68, n. 3, p. 209-227, 1983.
- VALENTINE, R. C.; VALENTINE, D. L. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: A unified concept. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 5, p. 383-402, 2004.
- WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3627-3652, 2005.

XUE, J. et al. Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. **Metabolic Engineering**, v. 27, p. 1-9, 2015.