

Herculano Cella

**RESPOSTAS MOLECULARES DA BIOSÍNTESE DE
CAROTENOIDES NA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum*
EM DIFERENTES IRRADIÂNCIAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Roberto Bianchini Derner

Florianópolis
2019

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

Cella, Herculano

Respostas moleculares da biossíntese de carotenoides na microalga *Phaeodactylum tricornutum* em diferentes irradiâncias / Herculano Cella ; orientador, Roberto Bianchini Derner, 2019.

82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Luz. 3. Microalga. 4. Nível de transcritos. 5. Pigmentos. I. Derner, Roberto Bianchini . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Respostas moleculares da biossíntese de carotenoides na microalga
Phaeodactylum tricornutum em diferentes irradiâncias**

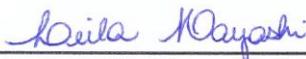
Por

HERCULANO CELLA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

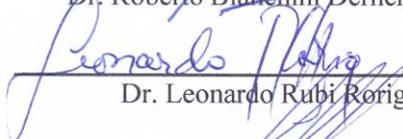


Profa. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:

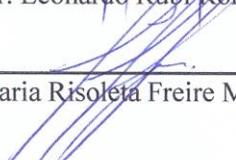


Dr. Roberto Bianchini Derner – *Orientador*



Dr. Leonardo Rubi Rorig - UFSC

Dra. Maria Risoleta Freire Marques - UFSC



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

AGRADECIMENTOS

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

À minha namorada Camila Lisarb, por todo o carinho que tenho recebido desde o dia em que te conheci. Agradeço pela parceria, confiança e pelas palavras de incentivo que me guiaram até aqui. Obrigado por existir na minha vida, meu amor, e por me fazer tão feliz. Te amo muito!

Aos meus orientadores Roberto Bianchini Derner e Rafael Garcia Lopes pela orientação, confiança e pelas oportunidades nestes 6 anos de laboratório. Tenho muita admiração por ambos.

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 realização da minha formação.

À equipe LCA, não somente pelos colegas que já passaram por ali, mas também pelos novos integrantes. Agradeço pelo companheirismo, sugestões e amizade.

À prof.^a Maria Risoleta Freire Marques e ao prof. Afonso Celso Dias Bainy pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, local fundamental para o desenvolvimento das análises deste trabalho.

A todos os integrantes do LABCAI que participaram direta ou indiretamente na execução deste projeto. Agradeço humildemente ao Jacó Joaquim Mattos e à Flávia Lucena Zacchi pelos conselhos e contribuições ao longo desta jornada. Agradeço também à Vera e Daína, pela amizade e apoio durante esta etapa.

Aos professores Leonardo Rubi Rörig e José Bonomi Barufi pelos ensinamentos e por estarem sempre prontos a ajudar.

Aos meus amigos, Henrique, Gustavo e Daniel, pois são os melhores e em todos os momentos estiveram ao meu lado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura – professores e servidores – da UFSC/CCA pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo dedicado na revisão e correção deste documento.

À CAPES pela bolsa de estudos (mestrado junto ao PPGAQI/UFSC). Ao MCTIC, ao CNPq e à FINEP.

Quando me dizem: “você enlouqueceu”

Sei que estou no caminho certo.

(Zack Magiezi)

RESUMO

O potencial biotecnológico das microalgas vem sendo explorado, particularmente em relação à obtenção de diversos compostos naturais (bioativos) presentes na biomassa. Dentre estes compostos, com elevado valor comercial, se destacam os carotenoides devido às suas aplicações na aquicultura e na saúde humana em nutracêuticos. A biossíntese dos carotenoides é regulada principalmente pela luz, porém ainda há um conhecimento limitado em relação aos mecanismos moleculares e à regulação da transcrição gênica nessa rota metabólica frente a esse contexto ambiental. Estudos apontam que a diatomácea *Phaeodactylum tricorutum* é uma espécie com grande potencial biotecnológico, portanto sugerem melhorias no que tange à produção de pigmentos. Neste trabalho foi proposto determinar o efeito de diferentes irradiâncias na produção de pigmentos e no perfil de transcrição gênica envolvidas na biossíntese dos carotenoides na microalga *Phaeodactylum tricorutum*. Foram empregadas duas irradiâncias (100 e 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com fotoperíodo 12:12, sendo que os cultivos experimentais foram comparados a partir da determinação da biomassa, das medições de fluorescência da clorofila *a* no Fotossistema II, da determinação do teor de pigmentos e análises da transcrição gênica por qPCR. As maiores biomassas foram alcançadas com o emprego de 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os resultados do Y_{II} e do F_v/F_m mostraram que a maior irradiância pode ter causado estresse às células de *P. tricorutum*. Além disso, neste tratamento foi verificada uma taxa de transferência de elétrons quatro vezes superior àquela do 100 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e conseqüentemente, mais energia foi dissipada pelo mecanismo NPQ. Com base na concentração de pigmentos e no nível de transcritos, com exceção do gene *LUT1*, todos os outros genes da via – *LCYB*, *ZEP1*, *ZEP2*, *ZEP3*, *VDE*, *VDL1* e *VDL2* foram influenciados, tanto pela irradiância, quanto pelo fotoperíodo, corroborando a ideia de que estes efeitos ambientais de fato influenciaram a biossíntese dos carotenoides em *P. tricorutum*.

Palavras-chave: Aquicultura. Luz. Microalga. Nível de transcritos. Pigmentos.

ABSTRACT

The biotechnological potential of microalgae has been explored, particularly in relation to obtaining several natural bioactive compounds present in the biomass. Among the compounds, with high commercial value, carotenoids are outstanding due to their applications in aquaculture and human health in nutraceuticals. The biosynthesis of carotenoids is mainly regulated by light, but there is still limited knowledge regarding the molecular mechanisms and the regulation of gene transcription in this metabolic pathway of this environmental context. Studies indicate that the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* is a model species with great biotechnological potential, therefore suggesting improvements in the production of pigments. In this work it was proposed to determine the effect of different irradiances on pigment production and on the gene transcription profile of carotenoid biosynthesis in the microalgae *Phaeodactylum tricornerutum*. Two irradiances (100 and 600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with 12:12 photoperiod were employed, and the experimental cultures were compared upon the biomass determination, chlorophyll *a* fluorescence measurement in photosystem II, determination of pigment content and gene transcription analyzes by qPCR. The highest biomasses were achieved using 600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the results of Y_{II} and F_v / F_m showed that the higher irradiance may have caused stress to *P. tricornerutum* cells. Moreover, this treatment was associated to an electron transfer rate four times higher than the treatment of 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and consequently, more energy was dissipated by the NPQ mechanism. Based on pigment content and gene transcript levels, with the exception of the *LUTI* gene, all other (pathway) genes - *LCYB*, *ZEP1*, *ZEP2*, *ZEP3*, *VDE*, *VDL1* and *VDL2* were influenced by both the amount of light and the photoperiod, corroborating the idea that these environmental effects actually influenced the carotenoid biosynthesis in *P. tricornerutum*.

Keywords: Aquaculture. Light. Microalgae. Pigments. Transcript level.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia da diatomácea <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP1055/1.	26
Figura 2 – Esquema gráfico da síntese dos isoprenoides em microalgas (via MEP).	29
Figura 3. Esquema gráfico da biossíntese dos carotenoides em diferentes clorofíceas.	32
Figura 4. Esquema gráfico da biossíntese dos carotenoides em diatomáceas.	34
Figura 5. Esquema gráfico da biossíntese dos carotenoides em <i>P. tricornutum</i> a partir do licopeno até a fucoxantina.	42
Figura 6. Concentração de biomassa (mg L^{-1}) em células de <i>P. tricornutum</i> expostas a duas irradiâncias (100 e $600 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo 12:12 durante 45 horas.	48
Figura 7. Valores do rendimento quântico efetivo (Y_{II}) e máximo (F_v/F_m) do PSII em células de <i>P. tricornutum</i> expostas a duas irradiâncias (100 e $600 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo 12:12 durante 45 horas.	50
Figura 8. Mudanças na taxa de transporte de elétrons (ETR) e no <i>non-photochemical quenching</i> (NPQ) em células de <i>P. tricornutum</i> exposta a duas irradiâncias (100 e $600 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo 12:12 durante 45 horas.	52
Figura 9. Concentrações de fucoxantina, clorofila <i>a</i> , clorofila <i>c</i> , β -caroteno e diadinoxantina (mg g^{-1}) em células de <i>P. tricornutum</i> exposta a duas irradiâncias (100 e $600 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo 12:12 durante 45 horas.	54
Figura 10. Nível de transcritos dos genes <i>LCYB</i> e <i>LUT1</i> em células de <i>P. tricornutum</i> exposta a duas irradiâncias (100 e $600 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo 12:12 durante 45 horas.	58
Figura 11. Nível de transcritos dos genes <i>ZEP1</i> , <i>ZEP2</i> e <i>ZEP3</i> em células de <i>P. tricornutum</i> exposta a duas irradiâncias (100 e $600 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo 12:12 durante 45 horas.	61
Figura 12. Nível de transcritos dos genes <i>VDE</i> , <i>VDL1</i> e <i>VDL2</i> em células de <i>P. tricornutum</i> exposta a duas irradiâncias (100 e $600 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo 12:12 durante 45 horas.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Carotenoides encontrados em diversas microalgas.....	27
Tabela 2 - Parâmetros calculados a partir de medições de fluorescência.....	44
Tabela 3. Lista de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes-alvo.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS: absorvância

ABSt: absortância

BCH: β -caroteno hidroxilase

BCK: β -caroteno quetolase

CDMDE: 4-(Citidina 50-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol

cDNA: sequência nucleotídica complementar de DNA

CEC: 2-Cmetil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato

CRISPR/Cas9: *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/Cas9*

DHA: ácido docosahexaenoico; do inglês *docosahexaenoic acid*

DMAPP: difosfato dimetilalilo

DME: 4-Difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOXP: 1-desoxixilulose-5-fosfato

DXR: 1-Deoxi-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase

DXS: 1-Deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase

EPA: ácido eicosapentaenoico; do inglês *eicosapentaenoic acid*

ETR: taxa de transporte de elétrons; do inglês *electron transport rate*

E_{PAR} : irradiância

F: fluorescência estável adaptada à luz (fluorescência emitida em uma situação normal de fotossíntese)

F_m: fluorescência máxima adaptada ao escuro (centros de reação fechados)

F_m' : fluorescência máxima adaptada à luz (centros de reação fechados)

F_o: fluorescência mínima adaptada ao escuro (centros de reação abertos)

F_v: fluorescência variável adaptada ao escuro

F_v/F_m: rendimento quântico máximo no PSII

F_{II}: fração do total de clorofila *a* no PSII

FCP: complexo proteico fucoxantina-clorofila *a/c*; do inglês *fucoxanthin-chlorophyll protein complex*

Fucoxantina: Fx

gDNA: DNA genômico

GGPP: geranilgeranil pirofosfato

GGPPS: geranilgeranil pirofosfato sintase

HMED: hidroxil-3-metilbut-2-enil difosfato

Histona H4: gene *histona H4*

IDI: difosfato de isopentenilo:difosfato de dimetilalilo isomerase

IPP: isopentenilpirofosfato

LCA: Laboratório de Cultivo de Algas

LCA-AM: Composição do meio Conway (1966) modificado no LCA/UFSC, empregado nas culturas de microalgas marinhas
LCYE: licopeno ϵ -ciclase
LCYB: licopeno β -ciclase
LCYB: gene *licopeno β -ciclase*
LUT1: luteína-like
LUT1: gene *luteína-like*
MEP: 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MEV: mevalonato
mRNA: RNA mensageiro
NPQ: dissipação não-fotoquímica; do inglês *non-photochemical quenching*
NXS: neoxantina sintase
PAM: fluorescência com pulso de amplitude modulada; do inglês *pulse-amplitude-modulation*
PCR: reação em cadeia da polimerase; do inglês *polymerase chain reaction*
PDS: fitoeno desaturase
PSII: fotossistema II
PSY: fitoeno sintase
PSY: gene *fitoeno sintase*
PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; do inglês *polyunsaturated fatty acids*
qPCR: PCR quantitativo em tempo real
RNA: ácido ribonucleico
TALEN: talen endonuclease; do inglês *transcription activator-like effector nucleases*
TBP: TATA-box binding protein
TBP: gene *TATA-box binding protein*
VDE: violaxantina de-epoxidase
VDE: gene *violaxantina de-epoxidase*
VDL1: gene *violaxantina de-epoxidase-like1*
VDL2: gene *violaxantina de-epoxidase-like2*
Y_{II}: rendimento quântico efetivo no PSII
ZDS: ζ -caroteno desaturase
ZEP: zeaxantina epoxidase
ZEP1: gene *zeaxantina epoxidase1*
ZEP2: gene *zeaxantina epoxidase2*
ZEP3: gene *zeaxantina epoxidase3*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	MICROALGAS.....	23
1.2	FONTE E IMPORTÂNCIA DOS CAROTENOIDES.....	24
1.3	DIATOMÁCEAS e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	25
1.4	BIOSSÍNTESE DOS CAROTENOIDES E ISOPRENOIDES ...	28
1.4.1	Pigmentos envolvidos na fotossíntese.....	35
1.4.2	Pigmentos envolvidos na fotoproteção.....	36
1.5	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> e BIOTECNOLOGIA	36
1.6	OBJETIVO GERAL.....	38
1.6.1	Objetivos específicos.....	38
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
2.1	INTRODUÇÃO.....	40
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.2.1	Organismo e condições de cultivo	43
2.2.2	Determinação da biomassa	43
2.2.3	Medições da fluorescência da clorofila <i>a</i> no fotossistema II ...	44
2.2.4	Determinação do teor de pigmentos	45
2.2.5	Extração de RNA e síntese de cDNA	45
2.2.6	Condições/análises da qPCR	45
2.2.7	Níveis de transcrição dos genes	47
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
2.4.1	Biomassa.....	47
2.4.2	Medições da clorofila <i>a</i> no PSII.....	49
2.4.3	Teor de pigmentos	53
2.4.4	Níveis de transcritos na biossíntese dos carotenoides.....	57
2.5	CONCLUSÃO.....	66

2.6	AGRADECIMENTOS.....	67
2.7	REFERÊNCIAS.....	67
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROALGAS

As microalgas são micro-organismos unicelulares – fotoautotróficos em sua maioria – encontrados em diversos ambientes úmidos e podem ser definidas como um grupo de organismos que possuem clorofila *a* como pigmento fotossintético primário e que abrange um grande número de taxa, sem ter, necessariamente, uma ligação evolutiva (LEE, 2008). Por integrar grande parte do fitoplâncton, é considerado o grupo responsável pela produção de oxigênio da atmosfera através da fotossíntese oxigênica (FALKOWSKI; RAVEN, 2007).

As microalgas são extremamente importantes em aquicultura, pois ao constituírem a base de diversas cadeias tróficas nos ambientes naturais, são empregadas como alimento para diversos organismos aquáticos cultivados, como larvas de crustáceos, moluscos e peixes, principalmente devido ao seu elevado valor nutricional (DERNER et al., 2006). Ademais, a utilização das microalgas tem ganhado destaque devido a sua função como biorremediadores, uma vez que têm sido empregadas na melhora da qualidade da água em efluentes provenientes da piscicultura (BORGES et al., 2005) e da carcinicultura (MAGNOTTI et al., 2015). Esta é uma estratégia de baixo custo e alta eficiência, pois estes organismos são capazes de assimilar compostos (principalmente nitrogênio e fósforo) – que em excesso causam a eutrofização (VIADERO et al., 2005) dos ambientes aquáticos.

Também, as microalgas podem ser utilizadas em diferentes fases do tratamento dos esgotos domésticos e/ou industriais, pela capacidade de reter metais pesados na biomassa (KUMAR et al., 2015). Embora haja um questionamento sobre o que fazer com a biomassa produzida em efluentes, pois dependendo dos nutrientes ou metais acumulados nesta, pode se tornar inviável para alimentação humana/animal, porém pode ser viável em outras atividades como o possível uso de biofertilizantes para a agroindústria (WIN et al., 2018).

Além disso, as microalgas podem apresentar diversas outras aplicações biotecnológicas, que incluem a extração de vários compostos de interesse (ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos, moléculas antioxidantes, compostos bioativos, carotenoides) da biomassa microalgal (PULZ; GROSS, 2004; SPOLAORE et al., 2006; CHEW et al., 2017).

Dentre os principais ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) encontrados nas microalgas, o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) são os compostos bioativos

mais importantes, considerados essenciais na saúde animal e humana. (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998; WEN; CHEN, 2003; SIMOPOULOS, 2008).

Nos últimos anos, uma das principais fontes disponíveis em escala comercial de EPA é o óleo de peixe e diante disto sua quantidade vem decrescendo devido ao aumento do consumo e a exploração excessiva dos estoques pesqueiros (BELARBI et al., 2000; TOCHER, 2010). Além disso, um possível problema potencial para a nutrição humana tem sido a presença de contaminantes como pesticidas e metais pesados (mercúrio, por exemplo) associados ao emprego de óleo de peixe como fonte de EPA (KHOZIN-GOLDBERG; ISKANDAROV; COHEN, 2011; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2014). Por isso, o cultivo de microalgas marinhas para a produção de PUFA n-3 é uma alternativa interessante devido à sua capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades destes compostos (PATIL et al., 2005; PATIL et al., 2007).

1.2 FONTE E IMPORTÂNCIA DOS CAROTENOIDES

As microalgas são fonte natural de diversos compostos, incluindo uma variedade de pigmentos, como as clorofilas, os carotenoides e as ficobiliproteínas, que têm funções específicas no metabolismo celular. Dentre estes compostos, os carotenoides têm elevado valor comercial, uma vez que são utilizados em muitas aplicações biotecnológicas (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007; MULDER et al., 2014).

Os carotenoides são tetraterpenos (com 40 átomos de carbono) – derivados dos isoprenoides, lipofílicos e geralmente coloridos, ou seja, absorvem a luz em diferentes faixas do espectro luminoso (400-550 nm), os quais lhe conferem coloração amarela, laranja, vermelha e marrom por exemplo, e são sintetizados por bactérias, fungos, plantas e algas (LICHTENTHALER, 1999; SANDMANN, 2002; SOLOVCHENKO; NEVEROV, 2017).

Estes compostos são divididos em dois grupos: os carotenos (cuja estrutura química é formada por hidrocarbonetos) e as xantofilas (carotenos oxigenados, também conhecidos como oxicarotenoides). Embora existam centenas de carotenoides distintos, as suas características estruturais são muito comuns devido à sua relação com a fotossíntese (FRANK; COGDELL, 1996; CHUYEN; EUN, 2015).

Os carotenoides desempenham diversas funções de extrema importância à saúde humana, pois estão associados às atividades antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias, com potencial aplicação nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (PANGESTUTI;

KIM, 2011, GONG; BASSI, 2016). Entretanto, estes compostos naturais não são sintetizados por humanos, assim devem ser assimilados através da dieta (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007).

Os carotenoides estão geralmente relacionados ao metabolismo secundário das microalgas (fotoproteção e alelopatia, por exemplo), e vêm sendo empregados em alguns setores da aquicultura, como na coloração da carne de camarões e de peixes (ex: salmão), além de reforçar a coloração da pele de peixes ornamentais (DILER; DILEK, 2002; BAKER; GÜNTHER, 2004). Dentre as microalgas produtoras de carotenoides, pode-se citar o grupo das clorofíceas que compreende as espécies *Haematococcus pluvialis* e *Dunaliella salina*, que são empregadas na produção comercial de astaxantina e β -caroteno, respectivamente (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007; MULDER et al., 2014).

1.3 DIATOMÁCEAS e *Phaeodactylum tricorutum*

Além das clorofíceas anteriormente citadas, outras classes também são produtoras de carotenoides, a exemplo de algumas diatomáceas (Classe Bacillariophyceae) (Tabela 1). As diatomáceas são micro-organismos fotossintéticos encontrados em ambientes marinhos e dulcícolas, responsáveis por até 25% da produtividade primária global (SCALA; BOWLER, 2001). Os representantes desta classe, possuem parede celular composta por uma frústula de silício, que em conjunto com outros nutrientes, são importantes para a eficiência fotossintética (LOPEZ et al., 2005).

Além da importância ecológica, as diatomáceas também apresentam um alto potencial biotecnológico, particularmente a produção de ácidos graxos (principalmente PUFA n-3), proteínas, carboidratos e carotenoides (XIA et al., 2018) que podem ser empregados principalmente na indústria alimentícia, como aditivos alimentares, e indústria farmacêutica (PANGESTUTI; KIM, 2011).

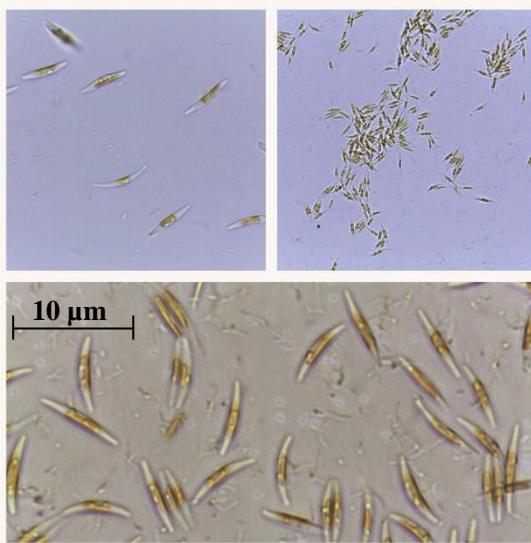
No grupo das diatomáceas, são encontrados majoritariamente oito tipos de carotenoides, que podem ser enquadrados em dois grupos: os carotenos, que incluem o β -caroteno; e as xantofilas, representadas pela zeaxantina, anteraxantina, violaxantina, neoxantina, diadinoxantina, diatoxantina e fucoxantina (COESEL et al., 2008; KUCZYNSKA et al., 2015).

Na classe Bacillariophyceae, se destaca *Phaeodactylum tricorutum* (Figura 1), que é uma diatomácea penada marinha reconhecida como um organismo-modelo para estudos fisiológicos e moleculares (DE MARTINO et al., 2007; BOWLER et al., 2008), além

de ser uma candidata interessante para a produção de carotenoides, principalmente fucoxantina (poderoso antioxidante e anticancerígeno), cujas aplicações envolvem importantes propriedades nutraceuticas no combate à diversas doenças (XIA et al., 2013; LIU et al., 2016; ANDRADE et al., 2018).

Os teores de fucoxantina em *P. tricornutum* podem atingir elevadas concentrações (até 22 mg g⁻¹ de biomassa seca) em certas condições de cultivo, como: concentração de nitrogênio, fase de crescimento, fotoperíodo, intensidade/qualidade de luz (RAGNI; D'ALCALÁ, 2007; XIA et al., 2013; VALLE et al., 2014; McCLURE et al., 2018; YI et al., 2018). Também, a limitação de alguns nutrientes, como o ferro, provoca alterações no metabolismo celular, que tem impacto na regulação da atividade fotossintética e, conseqüentemente, reduz a síntese deste pigmento (ALLEN et al., 2008; YOSHINAGA et al., 2014).

Figura 1. Fotografia da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* CCAP1055/1.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Tabela 1 - Carotenoides encontrados em diversas microalgas.

Microalgas	Carotenoides	Referências
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> *	β-caroteno, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina, neoxantina, diadinoxantina, diatoxantina, fucoxantina	Lohr e Wilhelm (2001)
<i>Thalassiosira pseudonana</i> *		Coesel et al., (2008) Kuczynska et al., (2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i> **	α-caroteno, β-caroteno,	Lamers et al. (2008)
<i>Dunaliella salina</i> **	luteína, zeaxantina,	Chan et al. (2013)
<i>Choricystis minor</i> var.	violaxantina, neoxantina	Fu et al. (2014)
<i>minor</i> **		Menezes et al. (2016) Mansouri e Hajizadeh (2018)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> **	luteína, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina	Faraloni e Torzillo (2013)
<i>Haematococcus pluvialis</i> **	α-caroteno, β-caroteno, luteína, anteraxantina, violaxantina, neoxantina, cantaxantina, astaxantina	Torzillo et al. (2003) Derner et al. (2006) Recht et al. (2014)

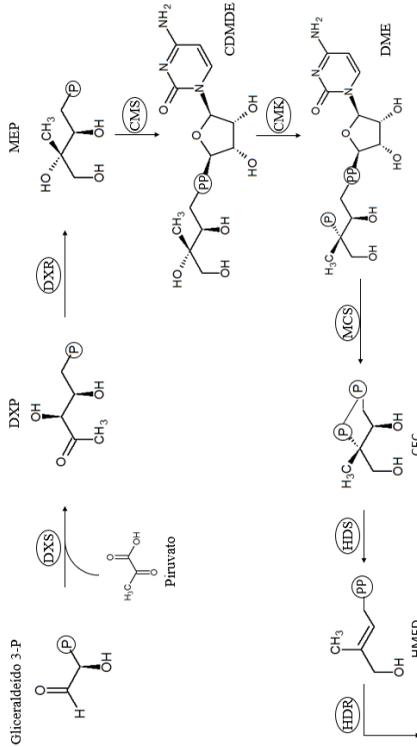
Um asterisco (*) indica o grupo das diatomáceas e dois asteriscos (**) indicam as clorófitas. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

1.4 BIOSÍNTESE DOS CAROTENOIDES E ISOPRENOIDES

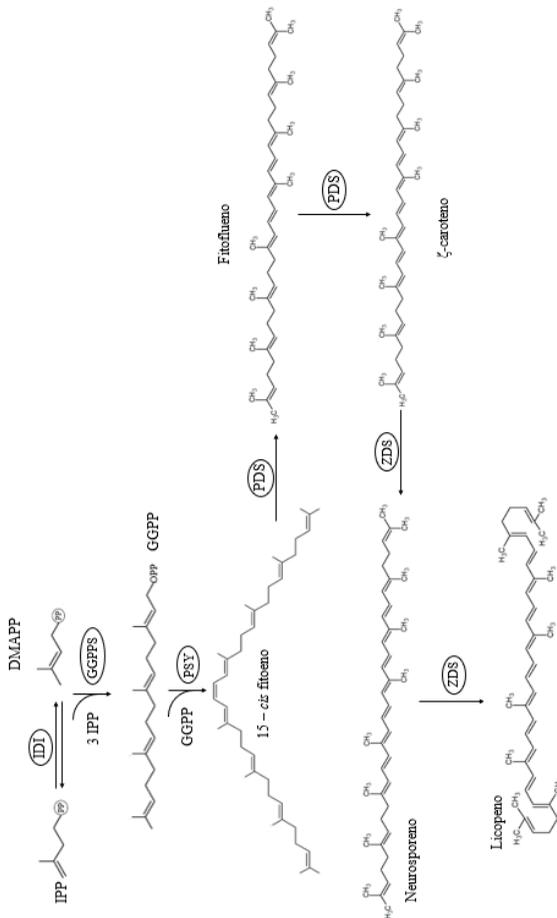
Os carotenoides são derivados da síntese dos isoprenoídeos, cujo principal precursor desta via é o isopentenilpirofosfato (IPP). Duas rotas foram descobertas a partir da molécula de IPP: a primeira conhecida como rota do Mevalonato (MEV), com os carotenoides presentes em fungos; e a segunda via, denominada 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), é encontrada em bactérias e nos plastídios de plantas e algas (LICHTENTHALER, 1999; ROHMER, 1999). Na Figura 2 estão representadas as rotas, que segundo Rohmer et al. (1993), a via de MEP começa com a formação do IPP a partir da rota alternativa do 1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP) que deriva da condensação do gliceraldeído-3-fosfato e do piruvato a partir da enzima 1-Deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS). Em seguida a reação é catalisada pela enzima 1-Deoxi-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase (DXR) a partir da molécula de DXP para a formação do MEP. Após algumas etapas são formados alguns intermediários como as moléculas de 4-(Citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDMDE), 4-Difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato (DME), 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (CEC) e 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato (HMED) até finalmente formar a molécula de IPP, com esta reação sendo catalisada pela enzima difosfato de isopentenilo:difosfato de dimetilalilo isomerase (IDI) originando o difosfato dimetilalilo (DMAPP). Em seguida ocorre a formação do geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) pela condensação das moléculas de IPP pela enzima GGPP sintase (GGPPS), que por sua vez leva à formação do fitoeno através da enzima fitoeno sintase (PSY). Este é um passo importante na biossíntese dos carotenoides, pois a enzima codificada pelo gene *PSY* é considerada uma das principais proteínas da via (KADONO et al., 2015; ZHOU et al., 2015).

Após a formação do fitoeno, alguns intermediários como fitoflueno, ζ -caroteno e neurosporeno são formados a partir das enzimas fitoeno desaturase e ζ -caroteno desaturase, (PDS) e (ZDS), respectivamente, dando origem ao licopeno, que é o precursor dos carotenoides. As próximas reações têm como finalidade o aumento das insaturações (duplas ligações) das moléculas, além da inserção de alguns grupos químicos como anéis aromáticos, epóxidos, hidroxilas e carbonilas (BERTRAND, 2010).

Figura 2 – Esquema gráfico da síntese dos isoprenoides em microalgas (via MEP).



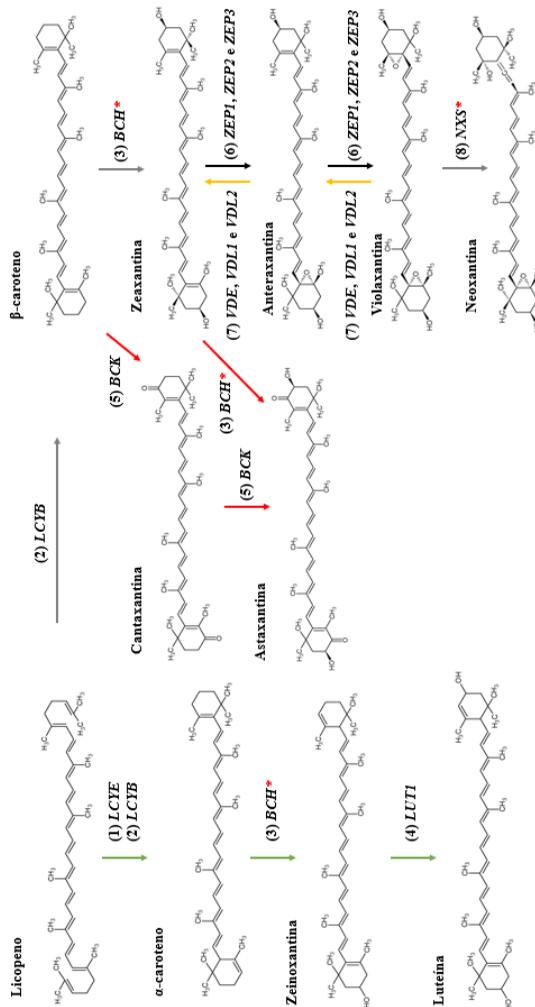
Continuação da Figura 2.



As primeiras etapas para a formação dos carotenoides a partir do gliceraldeído-3-fosfato até o lycopeno. As siglas das enzimas estão circuladas. As abreviações das enzimas são: DXS: 1-Deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase; DXR: 1-Deoxi-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase; CMS: 4-Difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintase; CMK: 4-(Citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol quinase; MCS: 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase; HDS: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintase; HDR: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase; IDI: difosfato de isopentenilo:difosfato de dimetilalilo isomerase; GGPPS: geranylgeranyl pirofosfato sintase; PSY: fitoeno sintase; PDS: fitoeno desaturase; ZDS: ζ-caroteno desaturase. Fonte: adaptado de Bertrand (2010).

A próxima etapa consiste na formação dos carotenos e das xantofilas em diferentes grupos de microalgas. No grupo das clorófitas (*Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, por exemplo) (Figura 3), o licopeno (Figura 3, seta verde) pode formar tanto a molécula α -caroteno a partir das enzimas licopeno ϵ -ciclase (LCYE) ou licopeno β -ciclase (LCYB). Em seguida a reação é catalisada pela enzima β -caroteno hidroxilase (BCH) a partir do α -caroteno formando a zeinoxantina que por sua vez é convertida em luteína pela enzima luteína-like (LUT1). Além disso, o licopeno (Figura 3, seta cinza) pode ser convertido em β -caroteno e zeaxantina através das enzimas LCYB e BCH (MIKAMI; HOSOKAWA, 2013). Por conseguinte, a zeaxantina pode ser convertida em violaxantina através das enzimas zeaxantina epoxidases (ZEP1, ZEP2, ZEP3). O caminho inverso se dá a partir das enzimas violaxantina epoxidases (VDE, VDL1, VDL2). Além disso, a violaxantina pode ser convertida em neoxantina através da enzima neoxantina sintase (NXS). Conforme a Figura 3 (seta vermelha) o β -caroteno pode ser convertido tanto em zeaxantina (*D. salina*) assim como em cantaxantina (*H. pluvialis*), através das enzimas BCH e β -caroteno quetolase (BCK), respectivamente, que por sua vez podem formar a molécula de astaxantina, através das enzimas BCK e BCH (WANG et al., 2014).

Figura 3. Esquema gráfico da biossíntese dos carotenoides em diferentes clorofíceas.



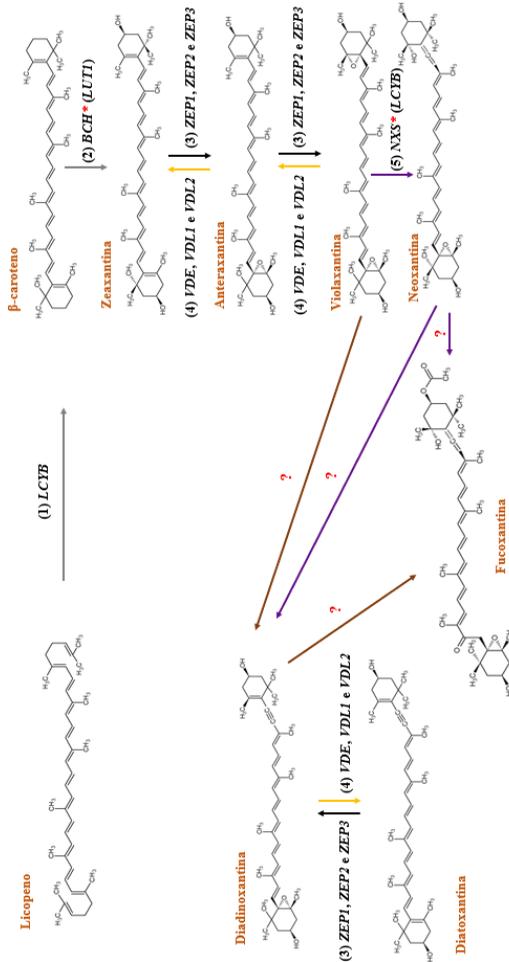
As siglas dos genes estão em itálico e os nomes das enzimas estão enumerados: (1): Licopeno ε-ciclase; (2): Licopeno β-ciclase; (3): β-caroteno hidroxilase; (4): Luteína-like; (5): β-caroteno quetolase; (6): Zeaxantina epoxidase; (7): Violaxantina de-epoxidase; (8): Neoxantina sintase. O asterisco (*) indica que o gene ainda não foi identificado. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Já os representantes do grupo das diatomáceas (*Phaeodactylum tricorutum* e *Thalassiosira pseudonana*, por exemplo) apresentam uma síntese mais extensa até a formação da fucoxantina (Figura 4). A biossíntese dos carotenoides em *P. tricorutum* foi descrita por Lohr e Wilhelm (2001) a partir do licopeno via reações de hidroxilação e epoxidação, e foram demonstradas duas rotas alternativas de produção das xantofilas. A primeira (Figura 4, seta marrom) considerando a violaxantina como precursora de diadinoxantina, diatoxantina e fucoxantina. A segunda rota, Dambek et al. (2012) (Figura 4, seta roxa) sugerem que a neoxantina seja precursora de diadinoxantina e fucoxantina. Com relação a esta segunda via alternativa, os mesmos autores propuseram que a neoxantina é um ponto de ramificação que impulsiona a síntese de diadinoxantina via formação de ligação triplas (grupo acetileno), ou fucoxantina via formação de ligações duplas (grupo aleno). No entanto, a detecção de um possível intermediário bioquímico e a identificação dos genes para a reação de cetolase e acetilase são necessários para apoiar a hipótese da neoxantina.

Segundo Coesel et al. (2008) e Bertrand (2010), outras enzimas da via permanecem não identificadas e/ou desconhecidas, tais como BCH e NXS que foram substituídas pelas enzimas LUT1 e LCYB, respectivamente. Até então, mesmo com o genoma de *T. pseudonana* e *P. tricorutum* sequenciados por Armbrust et al. (2004) e Bowler et al. (2008), respectivamente, esta via metabólica não está totalmente esclarecida, nem em nível bioquímico e nem molecular, embora estas hipóteses tenham sido propostas.

Conhecidamente, esta rota é regulada principalmente pela luz, tanto na quantidade (intensidade) quanto na qualidade (comprimentos de onda), portanto esse parâmetro tende a modular o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos desta via metabólica, sendo que essas mudanças na pigmentação levam a variações nas respostas fotossintéticas, bem como na taxa de crescimento (RAGNI; D'ALCALÀ, 2007; NIKOLAOU et al., 2016).

Figura 4. Esquema gráfico da biossíntese dos carotenoides em diatomáceas.



As siglas dos genes estão em *itálico* e os nomes das enzimas estão enumeradas: (1): Licopeno β-ciclase; (2): Luteína-like; (3): Zeaxantina epoxidase; (4) Violaxantina de-epoxidase; (5): Neoxantina sintase. O (*) indica que o gene ainda não foi identificado e o (?) indica os genes que não foram descobertos. As setas pretas e amarelas indicam as reações de epoxidação e de-epoxidação, respectivamente. As setas marrom e roxa indicam as hipóteses para a produção de fucoxantina propostas por Lohr e Wilhelm (2001) e Dambek et al. (2012), respectivamente. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

1.4.1 Pigmentos envolvidos na fotossíntese

A fucoxantina, pigmento majoritário e responsável pela coloração marrom das diatomáceas, está localizada junto às clorofilas (*a* e *c*) formando um complexo proteico denominado fucoxantina-clorofila *a/c* (FCP) localizado nas membranas tilacoides do cloroplasto, local onde ocorre a fase fotoquímica da fotossíntese, o qual desempenha um papel fundamental na captação de luz (GELZINIS et al., 2015).

Em razão das diferentes condições da luz na coluna d'água, as diatomáceas evoluíram e desenvolveram diferentes mecanismos e estratégias para otimizar a taxa fotossintética, como a fotoaclimatação e a fotoadaptação (RAGNI; D'ALCALÀ, 2007; NYMARK et al., 2013).

Durante a fotoaclimatação, a quantidade de pigmentos é regulada com base em mudanças na intensidade da luz, em um curto período de tempo (característica fenotípica). Em outras palavras, responde às condições de irradiância que incluem ajustes na quantidade e proporção das clorofilas *a*, *c* e fucoxantina, assim como no tamanho da unidade fotossintética, o que altera a capacidade de assimilação de carbono (NIKOLAOU et al., 2016). Geralmente, células aclimatadas em altas irradiâncias possuem um baixo teor de fucoxantina, enquanto em baixas irradiâncias, há um maior teor deste pigmento (ANNING et al., 2000).

Por outro lado, a fotoadaptação está relacionada a uma adaptação evolutiva a longo prazo (característica genotípica). A composição espectral da luz desempenha um papel importante na taxa de crescimento, atividade fotossintética e nos mecanismos de fotoproteção (COSTA et al., 2013; VALLE et al., 2014). No ambiente natural, as diatomáceas estão mais propensas a serem expostas a diferentes comprimentos de onda, principalmente à luz vermelha e azul, e outras condições como o fotoperíodo (HOLDSWORTH, 1985; LI; TALMY; CAMPBELL, 2017). Dependendo da polaridade do ambiente proteico FCP exposto a esta faixa espectral, três populações de fucoxantina (Fx) podem ser encontradas: Fx azul, Fx vermelho ou Fx verde, onde a faixa de absorção compreende os comprimentos de onda utilizados na fotossíntese (PREMVARDHAN et al., 2008).

Embora a fucoxantina seja um dos pigmentos acessórios utilizados na captação de luz, o sucesso ecológico das diatomáceas pode ser explicado pela sua capacidade de manter a atividade fotossintética no ambiente oceânico dominado pela luz azul. Esta característica confere às espécies bentônicas a habilidade de habitar regiões influenciadas pela turbulência e profundidade do ambiente marinho (MACINTYRE et al., 2000; STRZEPK; HARRISON, 2004).

1.4.2 Pigmentos envolvidos na fotoproteção

Uma das principais funções dos carotenoides é estar envolvido no mecanismo de fotoproteção que, por sua vez, conseguem dissipar com rapidez o estado excitado das clorofilas. E, por este motivo, devido à sua atividade antioxidante, protegem a célula de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio, o que promove o equilíbrio e a funcionalidade do aparato fotossintético (CHALLABATHUL et al., 2018).

Por exemplo, sob alta irradiância estes pigmentos têm a síntese aumentada, isto visa à proteção do aparato fotossintético de um potencial dano foto-oxidativo (OWENS et al. 1980; ANNING et al., 2000; RAGNI; D'ALCALÀ, 2007; NYMARK et al., 2013). Portanto, as diatomáceas fotoautotróficas têm mecanismos fotoprotetores para dissipar o excesso de energia, como o *non-photochemical quenching* (NPQ), que está associado ao estado de de-epoxidação dos carotenoides envolvidos no ciclo das xantofilas (LOHR; WILHELM, 1999; GOSS; LEPETIT, 2015).

As diatomáceas possuem dois ciclos de xantofilas, sendo um deles idêntico ao encontrado nas clorofíceas, onde a violaxantina é epoxidada pelas enzimas zeaxantina epoxidase (ZEP1, ZEP2, ZEP3) (Figura 4, seta preta) a partir da zeaxantina via anteraxantina. Este processo de epoxidação se dá em ambientes com pouca ou ausência de luz, e caso haja iluminação com alta intensidade, este mecanismo fotoprotetor dissipa o excesso de energia transformando a violaxantina em anteraxantina e zeaxantina através da enzima violaxantina de-epoxidase (VDE, VDL1, VDL2) (Figura 4, seta amarela). O outro ciclo refere-se ao ciclo principal das xantofilas nas diatomáceas e consiste na de-epoxidação (seta amarela) da diadinoxantina em diatoxantina ou na epoxidação (seta preta) da diatoxantina em diadinoxantina através das mesmas enzimas do ciclo da violaxantina (KUCZYNSKA et al., 2015). Entretanto, o ciclo diadino-diato é considerado mais eficiente, uma vez que a taxa de de-epoxidação deste ciclo é quatro vezes superior ao ciclo da violaxantina (LOHR; WILHELM, 1999).

1.5 *Phaeodactylum tricorutum* e BIOTECNOLOGIA

A partir da conclusão do sequenciamento do genoma dessa microalga, foram propostas novas estratégias para o conhecimento de sua fisiologia, o que permitiu uma compreensão mais aprofundada de alguns fatores que regulam importantes processos celulares em diatomáceas (BOWLER et al., 2008).

A recente disponibilidade de sequências do genoma oferece novas oportunidades para estudos sobre a expressão gênica em *P. tricorutum*

(SIAUT et al., 2007). Porém, os mecanismos moleculares relacionados ao sucesso evolutivo das diatomáceas ainda são inexplorados, sendo necessário o emprego de ferramentas moleculares, como a transformação genética, para estudos de genômica funcional (KROTH, 2007). Técnicas como TALEN endonuclease (CHRISTIAN et al., 2010) e CRISPR/Cas9 (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014) aplicadas à geração de bibliotecas visando famílias de genes ou o próprio genoma, podem facilitar a descoberta de novas funções genéticas como por exemplo, a descoberta das enzimas que sintetizam a fucoxantina em diatomáceas (KROTH et al., 2018).

Em um contexto ambiental, a regulação da transcrição gênica depende de mecanismos que são induzidos frente a determinadas condições de cultivo, porém, em muitos casos, os mecanismos por trás dessa plasticidade fisiológica ainda não são compreendidos (FALCIATORE et al., 2000; DEPAUW et al., 2012; KUCZYNSKA et al., 2015).

A diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* vêm ganhando atenção especial devido a sua capacidade de sintetizar compostos naturais que são utilizados em muitas aplicações biotecnológicas. Dentre estes compostos, os carotenoides (pigmentos de elevado valor comercial), por exemplo, têm sido amplamente empregados na aquicultura e na saúde humana como nutracêuticos. Porém, ainda não está claro como os fatores fisiológicos poderiam influenciar a biossíntese destes pigmentos em nível molecular. Diante disto, este estudo visou o entendimento da rota metabólica responsável pela síntese dos carotenoides na microalga *Phaeodactylum tricornutum*, permitindo um melhor conhecimento da produção desses pigmentos.

1.6 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito de diferentes irradiâncias na produção de pigmentos e no perfil de transcrição gênica associadas à biossíntese dos carotenoides na microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

1.6.1 Objetivos específicos

- Determinar a concentração dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, clorofila *c*, fucoxantina, diadinoxantina e β -caroteno) nas células da microalga *Phaeodactylum tricornutum*;
- Determinar o perfil de transcrição dos genes Licopeno β -ciclase (*LCYB*), β -caroteno hidroxilase (*LUT1*), Zeaxantina epoxidases (*ZEP1*, *ZEP2*, *ZEP3*) e Violaxantina de-epoxidases (*VDE*, *VDL1* e *VDL2*) nas células da microalga *Phaeodactylum tricornutum*;
- Determinar os parâmetros fotossintéticos da clorofila *a* no fotossistema II (Y_{II} , F_v/F_m , ETR e NPQ) nas células da microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido à revista Algal Research (ISSN: 2211-9264, IF: 3,994, Qualis A1, Área Zootecnia e Recursos Pesqueiros).

Respostas moleculares associadas à biossíntese dos carotenoides na microalga *Phaeodactylum tricornutum* submetida ao estresse luminoso

RESUMO

A biossíntese dos carotenoides nas diatomáceas é regulada principalmente pela luz, porém ainda há um conhecimento limitado em relação aos mecanismos moleculares e à regulação da transcrição gênica nessa rota metabólica frente a esse contexto ambiental. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi examinar como diferentes irradiâncias poderiam influenciar a atividade fotossintética, a concentração de pigmentos e o nível de transcritos envolvidos na biossíntese dos carotenoides em *Phaeodactylum tricornutum*. Foram empregadas duas irradiâncias (100 e 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com fotoperíodo 12:12 e duração de 48 horas, sendo os cultivos experimentais comparados a partir da determinação da biomassa, das medições de fluorescência da clorofila *a* no Fotossistema II, da determinação do teor de pigmentos e análises da transcrição gênica por qPCR. Os resultados apontaram que maiores biomassas foram alcançadas com iluminação de 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e os resultados do Y_{II} e do Fv/Fm mostraram que a maior irradiância pode ter causado estresse às células de *P. tricornutum*. Além disso, neste tratamento foi verificada uma taxa de transferência de elétrons quatro vezes superior àquela observada nas células do tratamento 100 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e consequentemente, mais energia foi dissipada pelo mecanismo NPQ. Com base na concentração dos pigmentos e no nível de transcritos, com exceção do gene *LUTI*, todos os outros genes da via – *LCYB*, *ZEP1*, *ZEP2*, *ZEP3*, *VDE*, *VDL1* e *VDL2* foram influenciados tanto pela irradiância quanto pelo fotoperíodo, corroborando a ideia de que estes efeitos ambientais de fato influenciam a biossíntese dos carotenoides em *P. tricornutum*.

Palavras-chave: Diatomácea. Irradiância. Pigmentos. Transcrição gênica.

2.1 INTRODUÇÃO

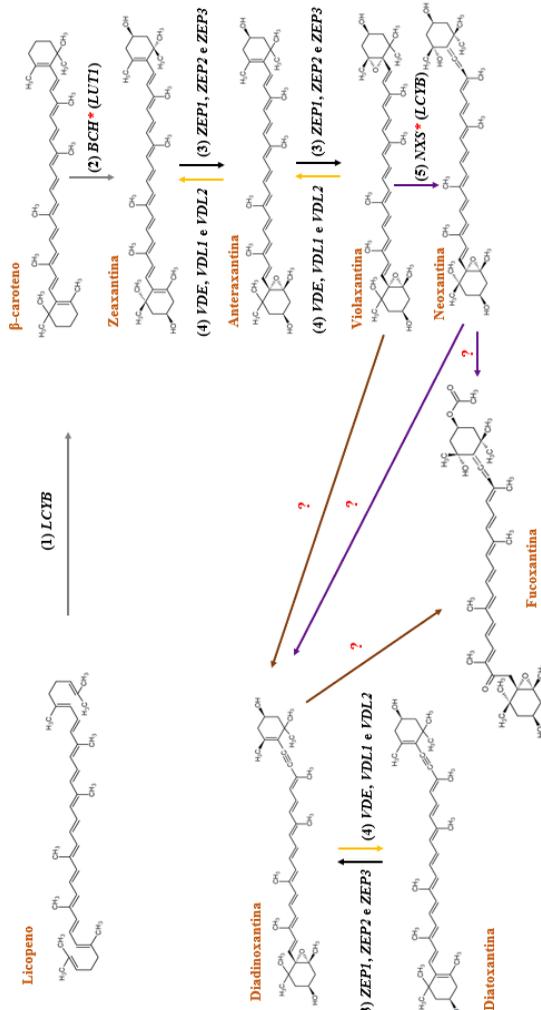
As diatomáceas planctônicas (Bacillariophyceae) são micro-organismos fotossintéticos encontrados em ambientes marinhos e dulcícolas, responsáveis por até 25% da produtividade primária global [1]. Possuem parede celular predominantemente constituída por uma frústula de silício, que em conjunto com outros nutrientes, são importantes para a eficiência fotossintética [2]. São fonte natural de diversos compostos, incluindo uma variedade de pigmentos, como as clorofilas e os carotenoides (pigmentos de elevado valor comercial), que têm funções específicas no metabolismo celular [3]. Entre as diatomáceas, são encontrados majoritariamente oito tipos de carotenoides, que podem ser enquadrados em dois grupos: os carotenos, que incluem β -caroteno; e as xantofilas, representadas pela zeaxantina, anteraxantina, violaxantina, neoxantina, diadinoxantina, diatoxantina e fucoxantina [4, 5]. Neste grupo, se destaca *Phaeodactylum tricornutum*, que é uma diatomácea penada marinha reconhecida como um organismo-modelo para estudos fisiológicos e moleculares [6, 7]. Além disso, é uma candidata interessante para a produção de carotenoides, principalmente de fucoxantina (poderoso antioxidante e anticancerígeno), cujas aplicações envolvem importantes propriedades nutraceuticas no combate à diversas doenças [8-10].

A biossíntese dos carotenoides (Figura 5) em *P. tricornutum* foi descrita por Lohr e Wilhelm [11] a partir do licopeno (precursor dos carotenoides) via reações de hidroxilação e epoxidação, e foram demonstradas duas rotas alternativas de produção das xantofilas, considerando a violaxantina como precursora de diadinoxantina, diatoxantina e fucoxantina, enquanto Dambek et al. [12] sugerem que a neoxantina seja precursora de diadinoxantina e fucoxantina. Conhecidamente, a biossíntese dos carotenoides é regulada principalmente pela luz e, diante disto, as diatomáceas respondem às variações na intensidade e qualidade de luz modulando o teor de pigmentos fotossintetizantes, entre eles as clorofilas (*a* e *c*) e o perfil de carotenoides. Tais mudanças na pigmentação conduzem às alterações nas respostas fotossintéticas, bem como, na taxa de crescimento [13, 14]. Embora as clorofilas sejam responsáveis pela captação da luz, as diatomáceas possuem um perfil de pigmentos diferente das outras microalgas. A fucoxantina, pigmento majoritário e responsável pela coloração marrom das diatomáceas, está localizada junto às clorofilas (*a* e *c*) formando um complexo proteico denominado fucoxantina-clorofila *a/c* (FCP) localizado nas membranas tilacoides do cloroplasto, local onde

ocorre a fase fotoquímica da fotossíntese [15]. Quando a intensidade luminosa é aumentada ou reduzida, *P. tricornutum* pode apresentar diferentes mecanismos e estratégias para otimizar a taxa fotossintética, por exemplo, em elevadas irradiâncias, estes pigmentos têm a síntese potencializada para proteger o aparato fotossintético de um potencial dano foto-oxidativo [13, 16-18]. Para isso, as diatomáceas fotoautotróficas desenvolveram mecanismos fotoprotetores para dissipar o excesso de energia como o *non-photochemical quenching* (NPQ) que está associado ao estado de de-epoxidação dos carotenoides envolvidos no ciclo das xantofilas [19, 20].

A partir da conclusão do sequenciamento do genoma de *P. tricornutum*, foram propostas novas estratégias para o conhecimento de sua fisiologia, o que permitiu uma compreensão mais aprofundada de alguns fatores que regulam importantes processos celulares em diatomáceas [7]. Em um contexto ambiental, a regulação da transcrição gênica depende de mecanismos que são induzidos frente a determinadas condições de cultivo, porém, em muitos casos, os mecanismos por trás dessa plasticidade fisiológica ainda não são compreendidos [5, 21, 22]. Desta forma o objetivo deste trabalho foi examinar como diferentes irradiâncias influenciaram a atividade fotossintética, a concentração de pigmentos e o nível de transcritos dos genes-alvo associados à via de biossíntese dos carotenoides em *P. tricornutum*.

Figura 5. Esquema gráfico da biossíntese dos carotenoides em *P. tricornutum* a partir do licopeno até a fucoxantina.



As siglas dos genes estão em itálico e os nomes das enzimas estão enumeradas: (1): Licopeno β -ciclase; (2): Luteína-like; (3): Zeaxantina epoxidase; (4) Violaxantina de-epoxidase; (5): Neoxantina sintase. O (*) indica que o gene ainda não foi identificado e o (?) indica os genes que não foram descobertos. As setas pretas e amarelas indicam as reações de epoxidação e de-epoxidação, respectivamente. As setas marrom e roxa indicam as hipóteses propostas por Lohr e Wilhelm [11] e Dambek et al. [12], respectivamente. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Organismo e condições de cultivo

A cepa da diatomácea *Phaeodactylum tricoratum* CCAP1055/1 está mantida no banco de cepas do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da Universidade Federal de Santa Catarina em meio LCA-AM (4 vezes mais nitrogênio e fósforo) modificado de Conway [23].

As culturas foram desenvolvidas em frascos de borossilicato contendo 1 L de meio LCA-AM, em agitação constante através do borbulhamento com ar atmosférico (com adição de 0,5% de CO₂ (v/v) durante o período iluminado) e em temperatura de 20 ± 0,5 °C. Durante o período escuro do ciclo não houve injeção de CO₂. O experimento foi desenvolvido em fotoperíodo 12:12 empregando dois tratamentos: irradiâncias de 100 e de 600 μmol fótons m⁻² s⁻¹, em quadruplicata. Estes valores foram previamente selecionados através dos resultados de uma curva P_{XI}, a fim de estabelecer uma irradiância cuja produção de oxigênio dissolvido não estivesse saturada (100 μmol fótons m⁻² s⁻¹) e quando já se encontrava na saturação (600 μmol fótons m⁻² s⁻¹). Para a curva P_{XI} foi empregado um painel de LED (75 W) e as irradiâncias foram determinadas com auxílio de um irradiômetro (LI-250A, LI-COR).

Antes do início do período experimental, as culturas de ambos os tratamentos foram aclimatadas nas respectivas irradiâncias durante 3 dias e foram mantidas com a mesma biomassa (50 mg L⁻¹) através da diluição diária a cada 24 horas. Durante o experimento, as culturas foram submetidas a dois ciclos em fotoperíodo 12:12 (simulação do ambiente natural) por 45 horas, e as amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (T0; T3; T6; T9; T15; T21; T27; T30; T33; T39 e T45) para a determinação da biomassa, das medições de fluorescência, para a determinação do teor de pigmentos e análises da transcrição gênica por qPCR.

2.2.2 Determinação da biomassa

A biomassa foi estimada indiretamente através da leitura da absorbância em 700 nm em espectrofotômetro (Genesys 10vis, Thermo), pela aplicação da de acordo com a equação: $Biomassa (mg L^{-1}) = ABS700 * 2,5$, R² = 0,9963.

2.2.3 Medições da fluorescência da clorofila *a* no fotossistema II

Os parâmetros fotossintéticos foram medidos através da fluorescência com pulso de amplitude modulada (WATER-PAM – Heinz Walz GmbH, 2000), de acordo com as metodologias de Klughammer e Schreiber [24] e Malapascua et al. [25] (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros calculados a partir de medições de fluorescência.

Medições	Símbolos	Fórmulas
Rendimento quântico efetivo no fotossistema II (PSII)	Y_{II} ou $\Delta F/Fm'$	$Y_{II} = (Fm' - F) / Fm'$
Rendimento quântico máximo no fotossistema II (PSII)	Fv/Fm	$Fv/Fm = (Fm - Fo) / Fm$
Taxa de transporte de elétrons (μmol elétrons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	ETR	$ETR = Y_{II} \times E_{PAR} \times \text{ABS}t \times F_{II}$
<i>Non-photochemical quenching</i>	NPQ	$NPQ = (Fm - Fm') / Fm'$

Fo, Fv e Fm = fluorescência mínima, variável e máxima no estado adaptado ao escuro. F e Fm' = fluorescência no estado estável e máxima no estado adaptado à luz. E = irradiância. ABS_t = absorptância. F_{II} = fração do total de clorofila *a* no PSII. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Durante a aclimação, os níveis de fluorescência mínimo (Fo) e máximo (Fm) foram medidos após uma adaptação no escuro por 10 minutos para calcular o rendimento quântico máximo no PSII (Fv/Fm), enquanto os níveis de fluorescência estável (F) e máxima (Fm') foram medidos após uma adaptação no período claro para calcular o rendimento quântico efetivo no PSII (Y_{II}). As fluorescências foram coletadas em intervalos de 1 hora (no escuro e no claro) a fim de determinar os rendimentos máximos, e após três dias, o Y_{II} se manteve constante, o que indica a aclimação das células à condição ambiental (o experimento só começou quando essa estabilidade no Y_{II} foi alcançada). Os valores de absorptância (ABS_t) e a fração do total de clorofila *a* no PSII (F_{II}) foram medidos de acordo com Johnsen e Sakshaug [26].

2.2.4 Determinação do teor de pigmentos

Em cada intervalo de tempo foram coletadas amostras de 15 mL de cada unidade experimental. As amostras foram filtradas com microfiltro de fibra de vidro 0,45 μm 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% e quantificados em espectrofotômetro (Genesys 10 vis, Thermo) nos comprimentos de onda 664, 630 e 480 nm, respectivamente [27]. A concentração de clorofila e dos carotenoides foi determinada conforme as metodologias de Jeffrey e Humphrey [28] e Carreto e Catoggio [29] respectivamente, de acordo com as equações abaixo. Todas as concentrações dos pigmentos foram normalizadas como mg g^{-1} de biomassa seca.

2.2.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras foram processadas de acordo com Siaut et al. [30]. Cada unidade experimental e centrifugadas a $2950 \times g$ durante 5 minutos, lavadas uma vez com água do mar estéril, com o pellet imediatamente congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O RNA total foi extraído a partir de uma amostra de 10^8 células, utilizando 1 mL de Qiazol Lysis Reagent (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA foi estimada em 260 nm, com a pureza sendo verificada em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo) nas relações 260/280 (>1.8) e 260/230.

Em seguida, o cDNA foi sintetizado com o QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Antes da transcrição reversa, 1 μg do RNA total foi tratado com o gDNA Wipeout Buffer empregando o mesmo kit por 2 minutos a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ para eliminar a contaminação do gDNA. Após o procedimento, a concentração do cDNA e sua pureza foram verificadas no Nanodrop, como descrito anteriormente.

2.2.6 Condições/análises da qPCR

Os iniciadores para os genes selecionados como alvo foram desenhados utilizando o software OlygoAnalyzer (IDT. <http://idtdna.com>) baseado nas sequências de mRNA a partir da DiatomCyc database (<http://www.diatomcyc.org>), resultando nos pares de iniciadores listados na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes-alvo.

Nomes dos genes	Nome dos iniciadores	Sequências	Tamanho dos fragmentos amplificados (nt)	Referências das sequências (NCBI)
<i>LCYB</i>	LCYBf	5'-AATCGGAGGTGGAGAAAGA-3'	90	XM_002176576.1
	LCYBr	5'-GACTCAAGATCCCTGCTTTG-3'		
<i>LUT1</i>	LUT1f	5'-GGCCGTGAAGCTAAAGTAA-3'	107	XM_002184999.1
	LUT1r	5'-CGTAATGGGTGCGAAGGTATC-3'		
<i>ZEP1</i>	ZEP1f	5'-TGTGAGGCTACCGAAGAT-3'	100	XM_002180202.1
	ZEP1r	5'-GTTTGGGGTAGTACTCTTGT-3'		
<i>ZEP2</i>	ZEP2f	5'-GCATCGTACGAGTGAGTATTG-3'	108	XM_002176899.1
	ZEP2r	5'-AGGACTTTCGGAGGTTGT-3'		
<i>ZEP3</i>	ZEP3f	5'-TGGTTGGAAGAACGACAAG-3'	93	XM_002178331.1
	ZEP3r	5'-AGCTCAAATAGGACCAGAGA-3'		
<i>VDE</i>	VDef	5'-TGGACGACTCTACATCTCAG-3'	99	XM_002178607.1
	VDeR	5'-CCGAAGAAGCTGCCCTTT-3'		
<i>VDL1</i>	VDL1f	5'-GAGTGACAAGGAAGCTCGATATG-3'	100	XM_002180599.1
	VDL1r	5'-GATCATGTGTTCCGGTGAGAG-3'		
<i>VDL2</i>	VDL2f	5'-CATCAAGGTCGCCATTCT-3'	98	XM_002180015.1
	VDL2r	5'-GCAGGGATTTCGGATCAA-3'		
<i>H4</i>	H4f	5'-ATTCTGTATTCCGTACCTATAC-3'	108	XM_002179469.1
	H4r	5'-TCCGAATCCGTAGAGAGTCTT-3'		
<i>TBP</i>	TBPf	5'-TACTGGTGCCAAGAAGGAAATG-3'	100	XM_002186285.1
	TBPt	5'-CCCGGGTACCGTAGTTATATGT-3'		

Fonte: elaborado pelo autor (2019).

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 foram amplificadas com o QuantiFast® SYBR® Green PCR kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o termociclador (Real-Time Cyler Rotor Gene Q®) (Qiagen) e rotor (Rotor Gene 6000 Series software) (Qiagen). 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 um total de 35 ciclos. Os fragmentos amplificados foram submetidos a uma curva de fusão (72 °C a 95 \pm 1 °C) para garantir que não ocorressem anelamentos não-específicos. Em cada corrida, um controle negativo de transcrição reversa (RNA tratado com DNase) foi incluído, assim como um branco de controle em duplicata (água molecular ultrapura). Não ocorreu amplificação após os 35 ciclos em todos os controles.

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 (1:2) com 400; 200; 100; 50 e 25 ng (em duplicata) a partir de um conjunto de todas as amostras de cDNA (88). Somente curvas com eficiências que variam entre 99% e 101% foram utilizadas e *E* foi automaticamente calculada empregando o software Rotor Gene 6000 Series.

2.2.7 Níveis de transcrição dos genes

Para a normalização dos níveis de transcrição foram utilizados como genes referência *H4* (Histona H4) e *TBP* (*TATA-box binding protein*) (Tabela 3) de acordo com Saut et al. [30]. Para uma análise da transcrição relativa mais robusta, aplicando o software geNORM, foi utilizada a média geométrica dos dois genes referência (Ref GM). O valor da média $2^{-\Delta Cq}$ 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 $2^{-\Delta Cq}$ [31] e apresentados como a razão \log_2 .

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

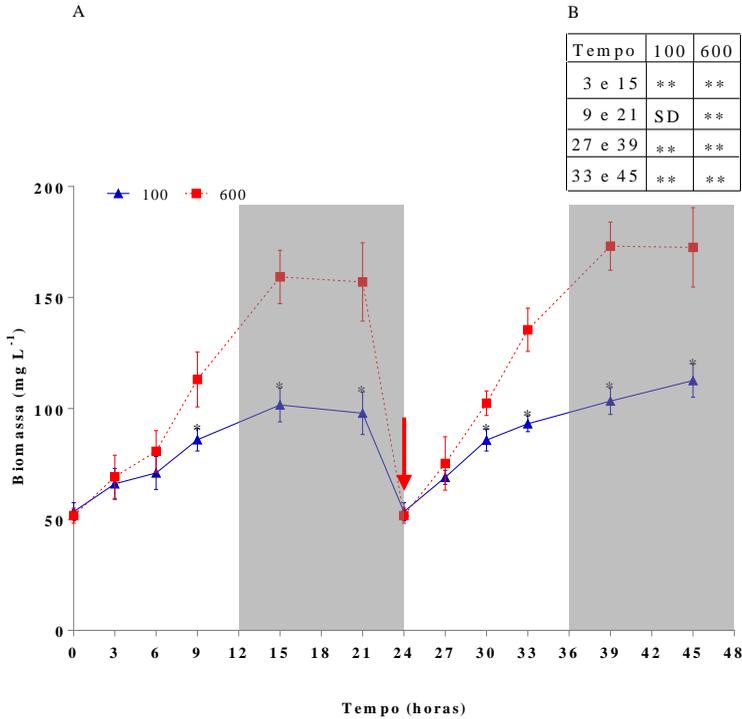
Os dados foram testados quanto à homogeneidade de variância (Teste de Levene) e normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) empregando o software Statistica 7,0. Foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (empregando o software GraphPad Prism 7) e as diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. Todos os dados de biomassa, das medições de fluorescência, do teor de pigmentos e níveis de transcritos estão apresentados como a média de cada tratamento (n=4) \pm desvio-padrão.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Biomassa

Na figura 6 é apresentado o efeito da intensidade da luz no acúmulo de biomassa, em fotoperíodo 12:12. Ambos os tratamentos (100 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram iniciados com a biomassa de 50 mg L^{-1} e, após as primeiras 24 horas, as culturas foram diluídas para a mesma biomassa inicial, afim de evitar um possível autossombreamento. Embora os valores de cada tratamento não tenham apresentado diferenças estatísticas nas primeiras 6 horas de cada ciclo (24 horas), há um acúmulo de biomassa em 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que se estende até o período escuro, chegando a alcançar aproximadamente o dobro ($p < 0,05$) como mostrado nos tempos 15-21 e 39-45. De acordo com Wagner et al. [32], o aumento da irradiância leva a uma maior atividade fotossintética, e conseqüentemente a uma maior concentração de biomassa. Ainda assim, quando comparados os tempos no claro com os tempos no escuro (T3-15; T9-21; T27-39 e T33-45), o acúmulo de biomassa pode ser influenciado tanto pela irradiância, quanto pelo fotoperíodo.

Figura 6. Concentração de biomassa (mg L^{-1}) em células de *P. tricorutum* expostas a duas irradiâncias (100 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoper\u00edodo 12:12 durante 45 horas.

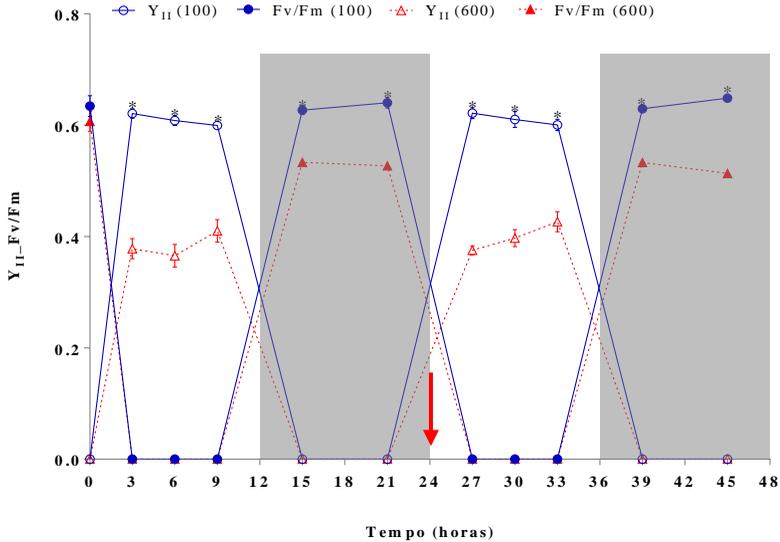


O ret\u00e2ngulo cinza representa o per\u00edodo escuro. A seta vermelha indica a dilui\u00e7\u00e3o \u00e0 mesma biomassa inicial (T_0). Todos os valores s\u00e3o apresentados como a m\u00e9dia ($n=4$) \pm desvio padr\u00e3o ($p<0,05$). O gr\u00e1fico A indica diferen\u00e7a significativa entre os dois tratamentos (*). A tabela B indica diferen\u00e7a estat\u00edstica entre o per\u00edodo claro e o per\u00edodo escuro em um intervalo de 12 horas no mesmo tratamento (**). SD = sem diferen\u00e7a. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

2.4.2 Medições da clorofila *a* no PSII

Conforme pode ser visualizado na Figura 7, o rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm) e o rendimento quântico efetivo do PSII (Y_{II}) variaram em média de 0,53 para 0,62 ($p < 0.05$) e 0,4 para 0,6 ($p < 0.05$) respectivamente, em ambos os ciclos e entre os dois tratamentos. Os valores obtidos de Fv/Fm estão dentro do esperado, uma vez que geralmente chegam próximos a 0,7 em culturas não estressadas [33]. Como esta variável é geralmente utilizada como indicador de fotoinibição e, frequentemente está associada a uma combinação entre elevada irradiância e outras condições de estresse [25], é possível suportar a ideia de que a irradiância de $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ causou estresse às células de *P. tricornutum*. Seguindo racioc\u00ednio semelhante, o mesmo aplica-se a irradi\u00e2ncia de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde os valores de Y_{II} (0,6) quase alcan\u00e7aram o valor m\u00e1ximo de Fv/Fm (0,62), indicando que as c\u00e9lulas n\u00e3o estavam estressadas. Pode-se observar tamb\u00e9m que n\u00e3o h\u00e1 diferen\u00e7as entre os rendimentos ao longo do tempo, o que indica que as c\u00e9lulas continuaram aclimatadas durante todo o cultivo experimental.

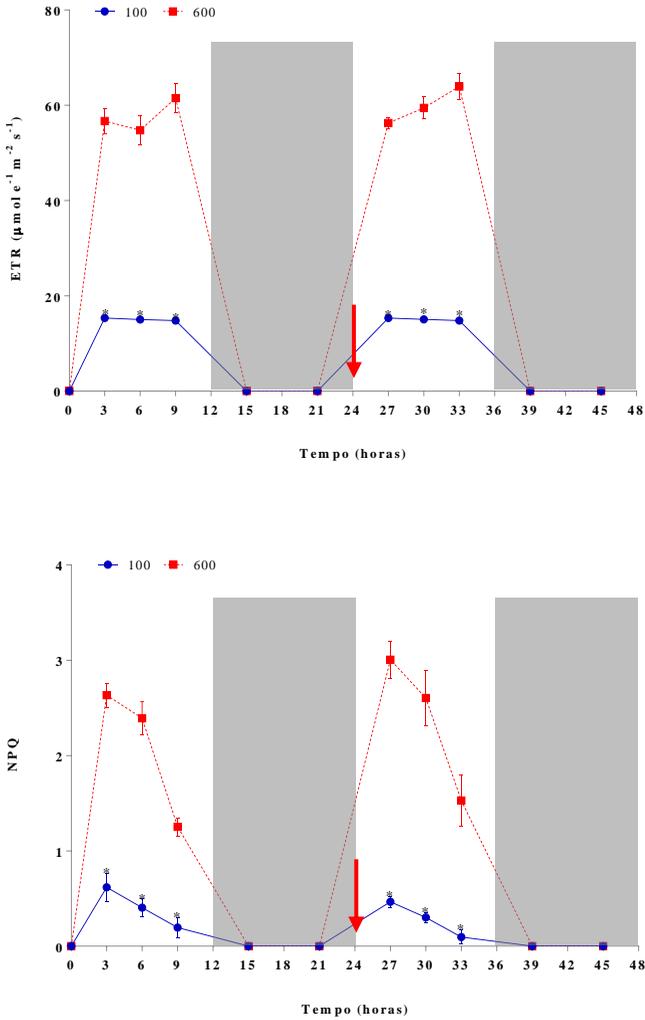
Figura 7. Valores do rendimento quântico efetivo (Y_{II}) e máximo (Fv/Fm) do PSII em células de *P. tricornutum* expostas a duas irradiâncias (100 e 600 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo 12:12 durante 45 horas.



O retângulo cinza representa o período escuro. A seta vermelha indica a diluição da cultura. Todos os valores estão apresentados como a média ($n=4$) \pm desvio padrão ($p<0,05$). (*) indica diferença significativa entre os dois tratamentos. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Além disso, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) na atividade fotossintética das células que foram expostas a irradiância de $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com valores de ETR quatro vezes superiores \u00e0queles obtidos com irradi\u00e2ncia de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e valores semelhantes em ambos os ciclos, como apresentado na Figura 8. Al\u00e9m do mais, a quantidade de luz n\u00e3o afetou a taxa de transporte de el\u00e9trons ao longo do tempo em ambos os tratamentos. Em rela\u00e7\u00e3o ao NPQ tamb\u00e9m houve diferen\u00e7as significativas entre as irradi\u00e2ncias ($p < 0.05$), com $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ levando a valores m\u00e1ximos (2,6) nas primeiras 3 horas de cultivo e decrescentes \u00e0 medida que se aproximava o per\u00edodo escuro. Esta redu\u00e7\u00e3o do NPQ pode estar relacionada a uma regula\u00e7\u00e3o r\u00e1pida (geralmente segundos) da fase fotoqu\u00edmica para conseguir desempenhar o mecanismo de fotoprote\u00e7\u00e3o com sucesso, assim como reportado por Lavaud [34]. Comparando os resultados do NPQ com os valores de ETR, pode-se observar que a satura\u00e7\u00e3o \u00e9 atingida por conta de se ter mais energia devido \u00e0 alta taxa fotossint\u00e9tica e conseq\u00fcentemente, por existir um excesso de energia, deve ser dissipado em forma de calor para evitar danos ao aparato fotossint\u00e9tico. Conforme Lavaud et al. [35], o NPQ tende a reduzir a emiss\u00e3o de fluoresc\u00eancia, ou seja, se torna inversamente relacionado ao Y_{II} e ao centro de rea\u00e7\u00e3o do PSII de modo a evitar danos foto-oxidativos pelo excesso de energia. Por outro lado, menores irradi\u00e2ncias apresentaram uma capacidade limitada no transporte de el\u00e9trons devido \u00e0 baixa convers\u00e3o de energia, o que implica numa limita\u00e7\u00e3o de respostas fotoprotetoras pelo NPQ [36].

Figura 8. Mudanças na taxa de transporte de elétrons (ETR) e no *non-photochemical quenching* (NPQ) em células de *P. tricornutum* exposta a duas irradiâncias (100 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoper\u00edodo 12:12 durante 45 horas.



O ret\u00e2ngulo cinza representa o per\u00edodo escuro. A seta vermelha indica a dilui\u00e7\u00e3o da cultura. Todos os valores est\u00e3o apresentados como a m\u00e9dia ($n=4$) \pm desvio

padrão ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa entre os dois tratamentos. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

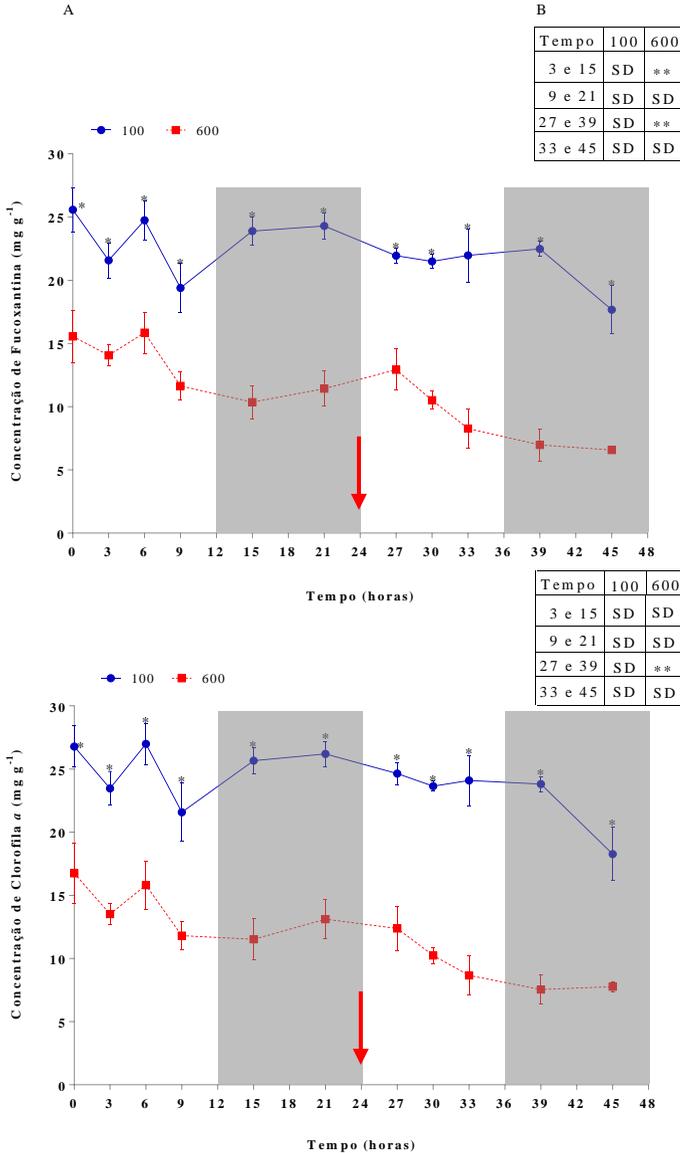
2.4.3 Teor de pigmentos

A concentração de pigmentos nas células de *P. tricornutum* variou expressivamente em ambos os tratamentos conforme apresentado na Figura 9. Os teores de fucoxantina, clorofila *a*, clorofila *c*, β -caroteno e diadinoxantina aumentaram significativamente ($p < 0,05$) nas células cultivadas com $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo maiores no T6 – 24,75; 26,98; 3,6; 0,90 e 1,67 mg g^{-1} respectivamente, em relação às culturas expostas a $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que apresentaram valores de 15,85; 15,8; 1,24; 0,61 e 1,31 respectivamente, no mesmo tempo. Segundo Durnford [37], a captação de luz nas microalgas é realizada a partir dos pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e carotenoides) que formam uma antena coletora de luz nas membranas tilacoides do cloroplasto. Assim, a dependência da quantidade de luz na concentração de pigmentos está relacionada com a função das células de maximizar a captura de luz sob regimes de pouca iluminação e dissipar energia em alta irradiância [14], o que corrobora com os valores encontrados neste experimento.

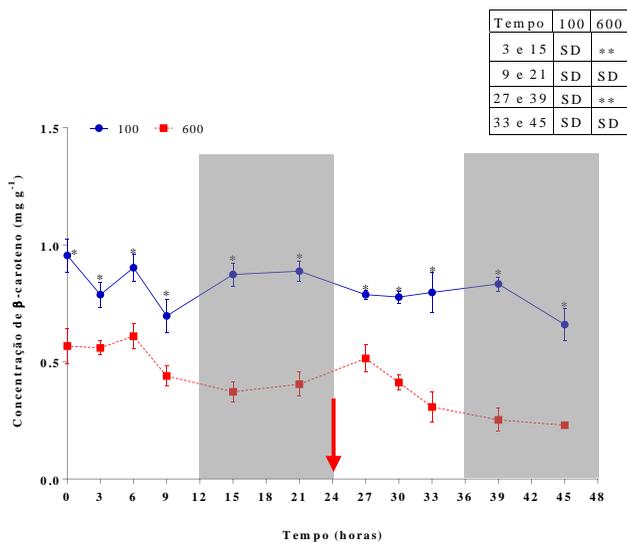
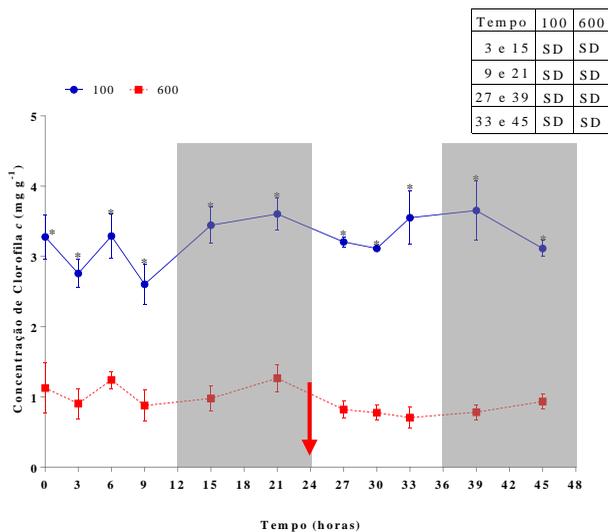
Durante as primeiras 24 horas de cultivo não houve diferença significativa no tratamento de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entre os tempos no claro (T3, T9, T27 e T39) e os tempos no escuro (T15, T21, T33 e T45). Após a diluição, os teores de fucoxantina, clorofila *a* e clorofila *c* tenderam a diminuir ao longo do tempo. Tendo em vista a baixa quantidade de luz, estes resultados podem estar associados a uma possível inativação da produção destes pigmentos, uma vez que a energia pode ter sido destinada para outras atividades da célula [22].

Em relação às células das culturas com $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, estas apresentaram um padrão semelhante na concentração de todos os pigmentos durante o período claro do ciclo, com uma redução significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo no período escuro do ciclo, resposta semelhante observada por Ragni e D'alcalà [13]. De fato, a alternância entre o ciclo claro/escuro é uma característica da maioria dos ambientes naturais, sugerindo que o metabolismo destes compostos esteja relacionado ao fotoperíodo e não somente a quantidade de luz [13].

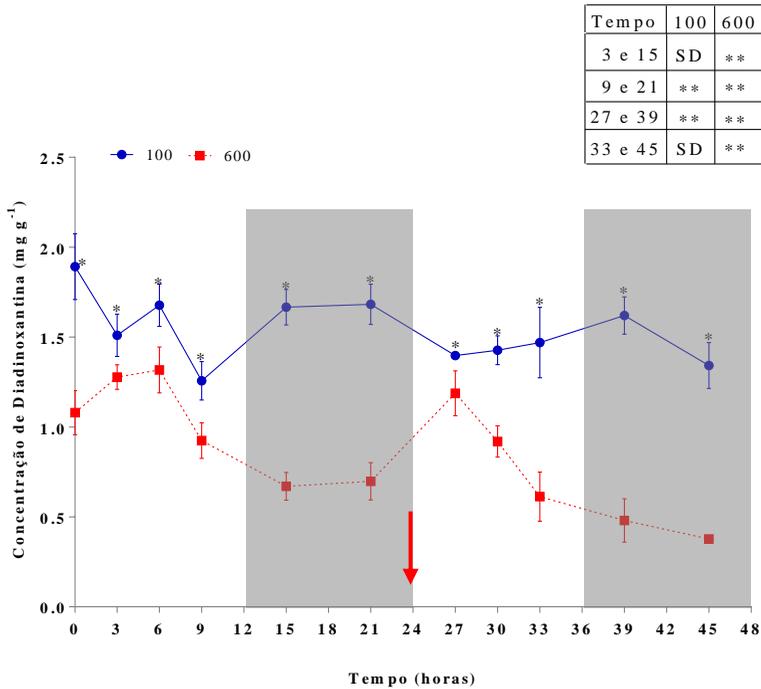
Figura 9. Concentrações de fucoxantina, clorofila *a*, clorofila *c*, β -caroteno e diadinoxantina (mg g^{-1}) em células de *P. tricornutum* exposta a duas irradiâncias (100 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoper\u00edodo 12:12 durante 45 horas.



Continuação da Figura 9.



Continuação da Figura 9.



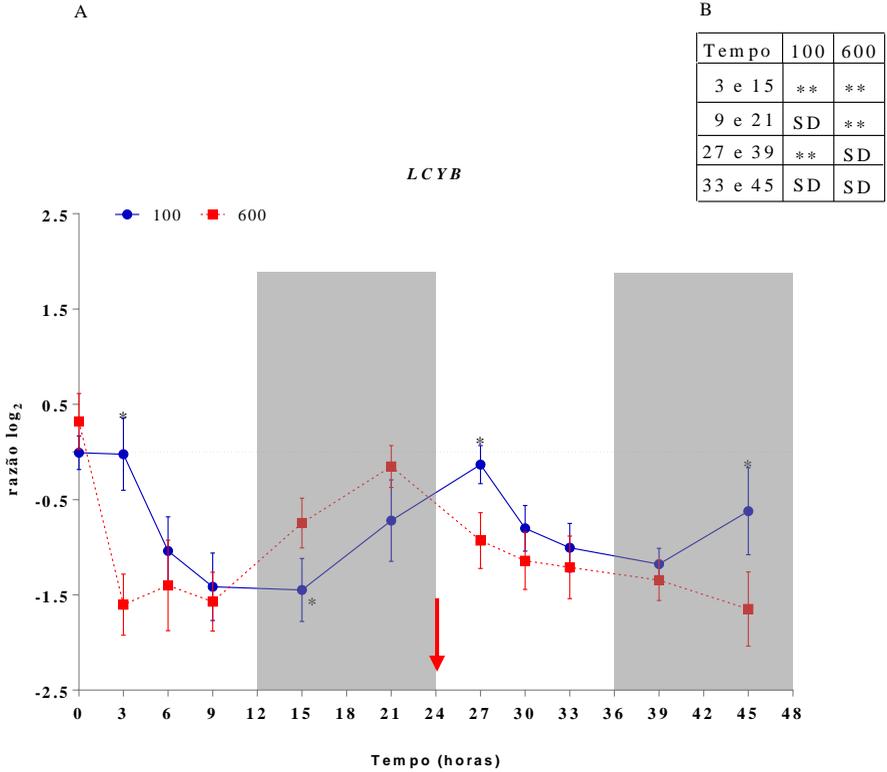
O retângulo cinza representa o período escuro. A seta vermelha indica a diluição da cultura. Todos os valores estão apresentados como a média ($n=4$) \pm desvio padrão ($p<0,05$). O gráfico A indica diferença significativa entre os dois tratamentos (*). A tabela B indica diferença estatística entre o período claro e o período escuro em um intervalo de 12 horas no mesmo tratamento (**). SD = sem diferença. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

2.4.4 Níveis de transcritos na biossíntese dos carotenoides

A biossíntese dos carotenoides em *P. tricornutum* está sujeita a variações de acordo com alguns fatores ambientais (intensidade de luz e regime de iluminação, por exemplo) aos quais as células são expostas.

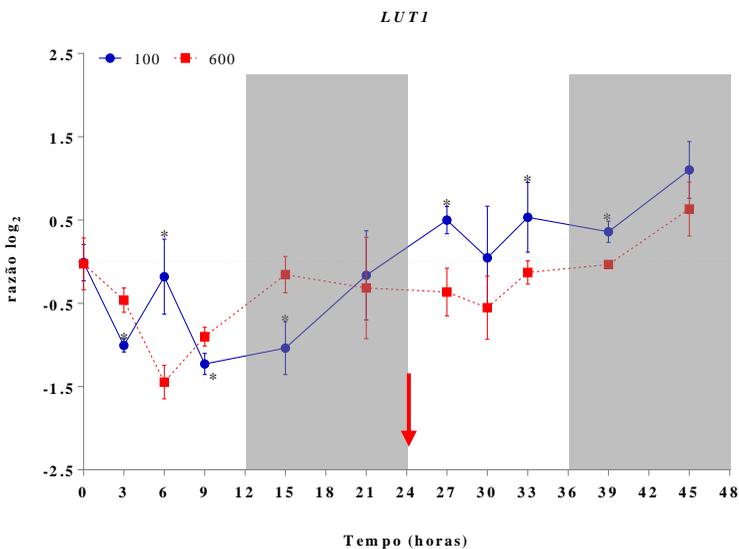
O metabolismo dos carotenoides é conhecido por ser influenciado por condições de estresse [5, 18, 38], assim, é possível investigar possíveis regulações nos níveis de transcrição dos genes envolvidos na via de síntese. Conforme pode ser visualizado na Figura 10, a enzima licopeno β -ciclase, codificada pelo gene *LCYB*, apresenta um padrão similar de subexpressão (*down-regulation*) nos dois tratamentos, com a redução do nível de transcritos ($p < 0,05$) no período claro e um aumento ($p < 0,05$) no período escuro do ciclo, caracterizado por uma suposta sincronização relacionado ao fotoperíodo, porém sem diferenças entre as diferentes irradiâncias. Embora este gene seja o responsável pela formação do β -caroteno (precursor dos próximos carotenoides da via), a concentração deste pigmento (Figura 9) foi influenciada tanto pela irradiância como pelo fotoperíodo, assim como observado por Faraloni e Torzillo [39]. Este resultado sugere que a regulação deste gene possa ser um fator chave na geração da diversidade dos carotenoides, conforme reportado por Wang et al. [40]. Em relação ao gene *LUTI*, responsável pela produção de zeaxantina a partir do β -caroteno, este mostrou-se ser pouco regulado em função da irradiância e do fotoperíodo. Embora o gene *LUTI* seja o responsável pela produção de luteína nas clorofíceas, este pigmento está associado à captação de luz no complexo antena [41] assim como a fucoxantina nas diatomáceas [15]. Ainda que a enzima β -caroteno hidroxilase (BCH) não tenha sido encontrada no genoma de *P. tricornutum* e assim substituída pela enzima putativa LUT1 [4], sugere-se que a função desta proteína seja diferente nestes dois grupos de algas.

Figura 10. Nível de transcritos dos genes *LCYB* e *LUTI* em células de *P. tricornutum* exposta a duas irradiâncias (100 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoper\u00edodo 12:12 durante 45 horas.



Continuação da Figura 10.

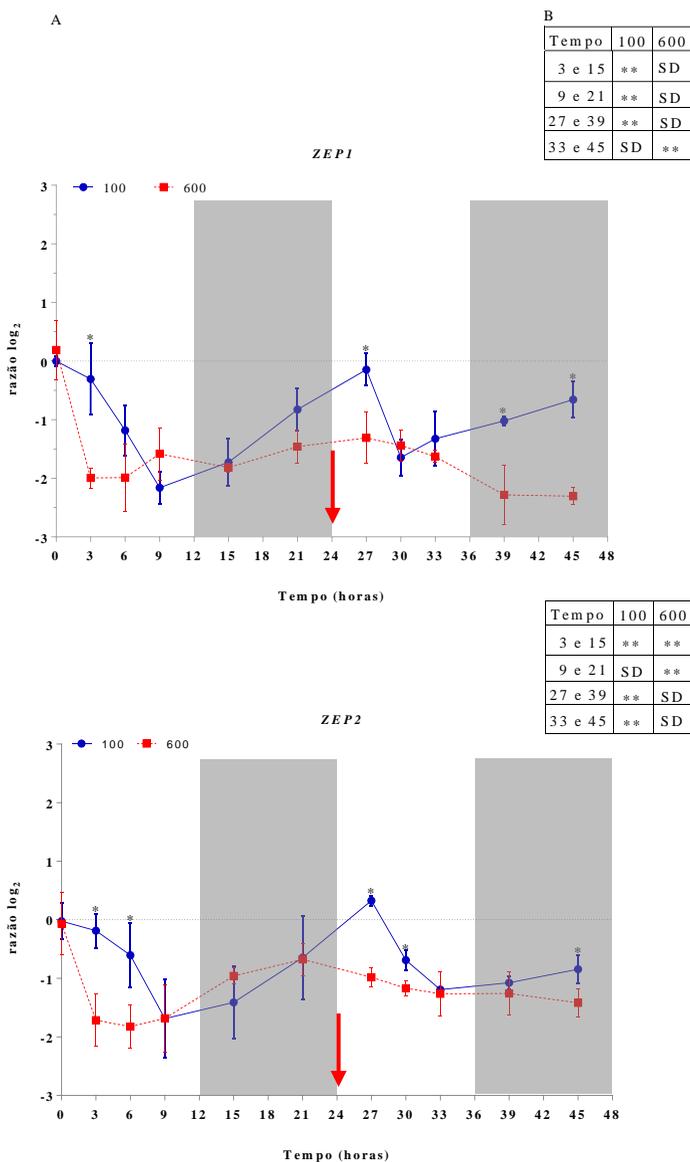
Tempo	100	600
3 e 15	SD	SD
9 e 21	**	SD
27 e 39	SD	SD
33 e 45	SD	**



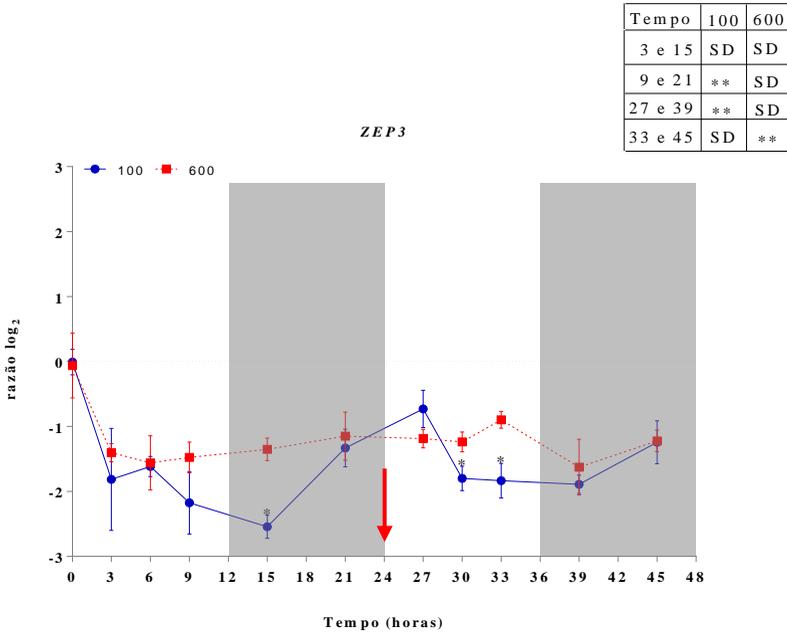
O retângulo cinza representa o período escuro. A seta vermelha indica a diluição da cultura. Todos os valores estão apresentados como a média ($n=4$) \pm desvio padrão ($p<0,05$). O gráfico A indica diferença significativa entre os dois tratamentos (*). A tabela B indica diferença estatística entre o período claro e o período escuro em um intervalo de 12 horas no mesmo tratamento (**). SD = sem diferença. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

No presente trabalho, as respostas mais interessantes e representativas foram a regulação instantânea dos genes dependentes de luz e com reações reversíveis que estão ligados ao papel de fotoproteção, ou seja, o ciclo das xantofilas. No primeiro grupo (Figura 11), que engloba os três genes que codificam a enzima zeaxantina epoxidase (*ZEP1*, *ZEP2* e *ZEP3*), estes tiveram um comportamento similar, principalmente com a irradiância de $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, os n\u00edveis de transcri\u00e7\u00e3o desses genes foram, em geral, pouco afetados pela exposi\u00e7\u00e3o a alta irradi\u00e2ncia, assim como reportado por Nymark et al. [38]. J\u00e1 em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 irradi\u00e2ncia de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, \u00e9 poss\u00edvel observar uma certa sincroniza\u00e7\u00e3o devido ao fotoper\u00edodo, com estes genes sendo transcritos ($p < 0,05$) mais claramente no per\u00edodo escuro (T15-21; T39-45) e com uma redu\u00e7\u00e3o mais acentuada no n\u00edvel de transcri\u00e7\u00e3o dos genes *ZEP1* e *ZEP2* no per\u00edodo claro (T9). Isto pode ser explicado pelo perfil no ac\u00famulo de diadinoxantina quando exposta a baixa irradi\u00e2ncia. Diante disto, a aus\u00eancia ou redu\u00e7\u00e3o na quantidade de luz induz a um aumento na efici\u00eancia da capta\u00e7\u00e3o de luz no complexo antena e conseq\u00fcentemente a um aumento no conte\u00fado pigmentar no in\u00edcio do per\u00edodo escuro [42], assim como observado na Figura 9.

Figura 11. Nível de transcritos dos genes *ZEP1*, *ZEP2* e *ZEP3* em células de *P. tricornutum* exposta a duas irradiâncias (100 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoper\u00edodo 12:12 durante 45 horas.



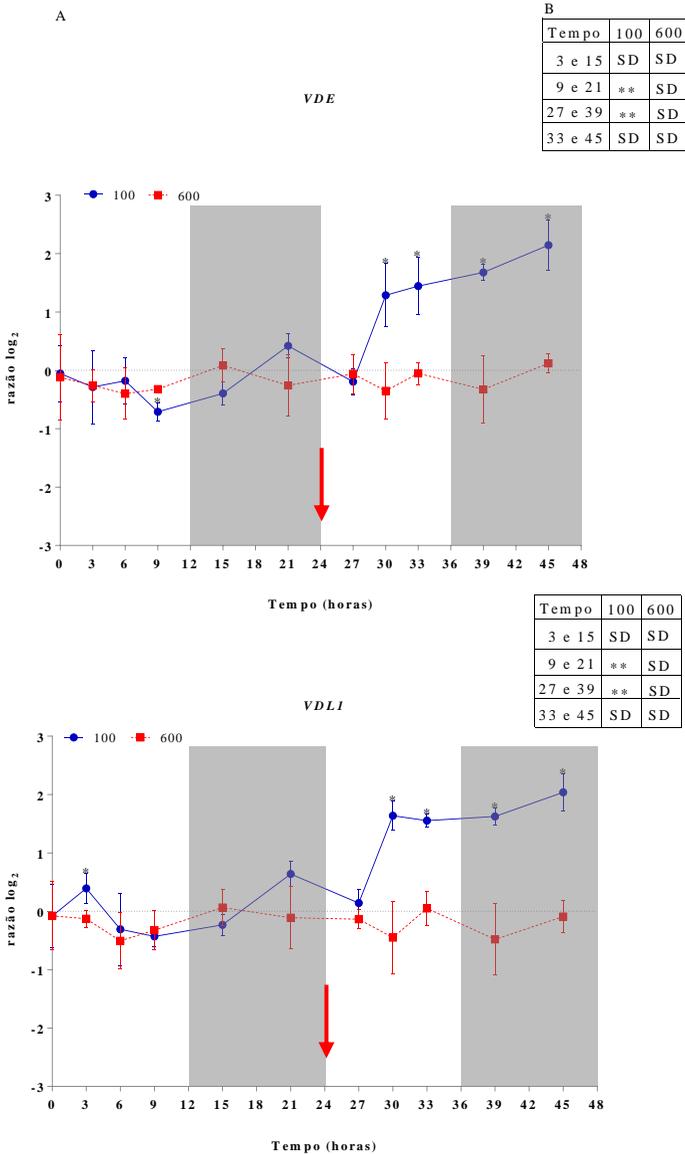
Continuação da Figura 11.



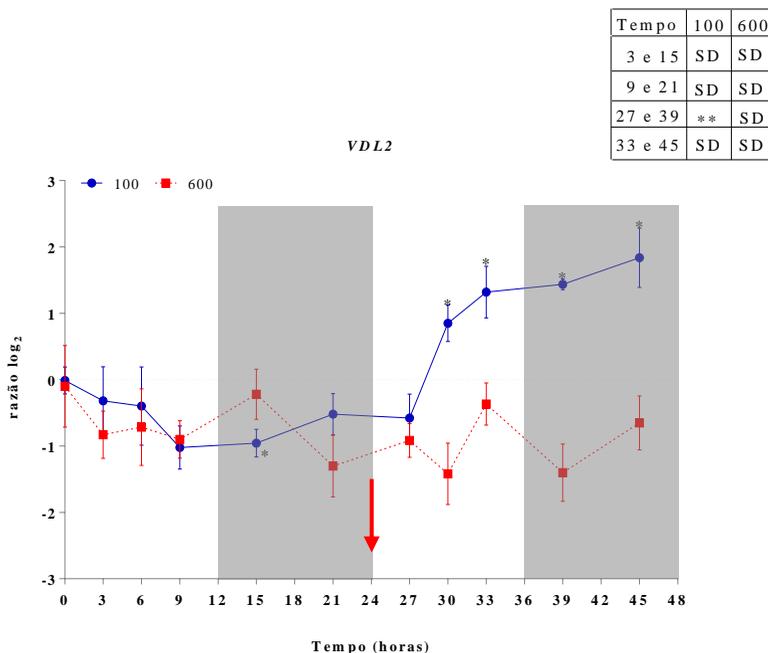
O retângulo cinza representa o período escuro. A seta vermelha indica a diluição da cultura. Todos os valores estão apresentados como a média ($n=4$) \pm desvio padrão ($p<0,05$). O gráfico A indica diferença significativa entre os dois tratamentos (*). A tabela B indica diferença estatística entre o período claro e o período escuro em um intervalo de 12 horas no mesmo tratamento (**). SD = sem diferença. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

O segundo grupo (Figura 12) é constituído pelos três genes que codificam a enzima violaxantina de-epoxidase (*VDE*, *VDL1* e *VDL2*), esta responsável pela conversão reversível de violaxantina em zeaxantina e de diadinoxantina em diatoxantina em um estado de grande dissipação de energia, devido à alta irradiância. Todos estes genes apresentaram um perfil muito constante sob alta irradiância durante as 45 horas do experimento, independente do fotoperíodo. Ao contrário dos *ZEP*'s, estes genes são essencialmente necessários para evitar um possível dano foto-oxidativo ao aparato fotossintético e, assim, permitir uma captação de luz mais eficiente em condições de baixa irradiância [43]. Ademais, as culturas desenvolvidas com $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ também apresentaram um perfil constante na dissipação de energia nas primeiras 24 horas do experimento. Entretanto, após a diluição, *VDE*, *VDL1* e *VDL2* apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no nível de transcritos, com valores máximos de 4,3; 4 e 3,6-fold change respectivamente no período escuro, em comparação à irradiância de $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, que quase não houve variação no nível de transcritos relativo. Levando em consideração o aumento inicial do NPQ nas 3 primeiras horas de cultivo (T3; T27) e com um relaxamento mais rápido perto do período escuro (T9; T33), estes resultados podem indicar que o ciclo das xantofilas pode ter sido restaurado e este aumento no nível de transcritos pode estar relacionado a uma possível suspensão do mecanismo de dissipação de energia [44].

Figura 12. Nível de transcritos dos genes *VDE*, *VDL1* e *VDL2* em células de *P. tricornutum* exposta a duas irradiâncias (100 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoper\u00edodo 12:12 durante 45 horas.



Continuação da Figura 12.



O retângulo cinza representa o período escuro. A seta vermelha indica a diluição da cultura. Todos os valores estão apresentados como a média ($n=4$) \pm desvio padrão ($p<0,05$). O gráfico A indica diferença significativa entre os dois tratamentos (*). A tabela B indica diferença estatística entre o período claro e o período escuro em um intervalo de 12 horas no mesmo tratamento (**). SD = sem diferença. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Nas diatomáceas, o NPQ é principalmente controlado pela interconversão entre a epoxidação e de-epoxidação dos carotenoides enquadrados no ciclo das xantofilas, os quais estão correlacionados com a quantidade de luz [20, 45]. Conforme os resultados obtidos, é possível suportar a ideia de que a dissipação de energia está interligada com os processos fisiológicos e moleculares em *P. tricornutum*. Ao que tudo indica, a regulação dos genes *VDE*, *VDL1* e *VDL2* em alta irradiância foi possível observar um aumento do NPQ e conseqüentemente uma redução no teor de diadinoxantina que, provavelmente, esteja sendo sintetizada muita diatinoxantina [36, 46]. Conforme pode ser visualizado na Figura 9, como o teor de fucoxantina também está reduzido, acredita-se que este

pigmento de fato não esteja relacionado com o papel de fotoproteção [47]. Ainda assim, o excesso de luz não perturbou a capacidade do aparato fotossintético e nem a capacidade das células para a produção de biomassa. Apesar do conteúdo dos carotenoides ser modulado por condições de estresse luminoso, também é possível destacar o período em que a cultura se encontra (ciclo claro/escuro) como responsável pelos efeitos sob a biossíntese e o acúmulo de fucoxantina. Ainda que outros grupos de microalgas apresentam uma via de síntese mais estabelecida, ainda não está totalmente esclarecida a biossíntese em um nível molecular nas diatomáceas, principalmente pela falta de conhecimento em relação as enzimas que sintetizam a fucoxantina.

No presente estudo foi proposto investigar os mecanismos celulares responsáveis pelas condições de estresse em alta irradiância, levando em consideração o regime de iluminação (fotoperíodo). Isso mostra a relevância de se compreender o efeito do ciclo celular na biossíntese e acúmulo destes pigmentos, uma vez que se busca melhorar os rendimentos dos sistemas de produção. Os resultados deste trabalho mostraram que podem ser empregadas estratégias de cultivo para a produção dos pigmentos de interesse, como por exemplo, o cultivo em duas fases. Neste cenário, a primeira etapa seria o alcance da máxima produção de biomassa (fase vegetativa) pela irradiância de $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ seguida da segunda etapa, onde a iluminação de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ induziria as células a produzir uma maior concentração destes compostos. Após a extensiva pesquisa bibliográfica sobre este assunto, o presente primeiro trabalho parece se tratar do estudo que explora a combinação dos parâmetros fisiológicos (teor de pigmentos e parâmetros fotossintéticos) com os parâmetros moleculares (níveis de transcritos) na biossíntese dos carotenoides em *P. tricornutum*, com o intuito de mimetizar o ambiente natural *in vitro*.

2.5 CONCLUSÃO

Neste estudo, a produção de biomassa foi 1,5 vezes maior na irradiância de $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mesmo com mais estresse luminoso de acordo com os parâmetros fotossintéticos. Por outro lado, os teores dos pigmentos foram mais elevados com a irradiância de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O perfil de transcrição dos genes *LCYB*, *ZEP1*, *ZEP2*, *ZEP3*, *VDE*, *VDL1* e *VDL2* foi influenciado pelas irradiâncias e o fotoperíodo, com exceção do gene *LUTI*. Além disso, um padrão de transcrição similar foi encontrado entre as isoformas dos genes *ZEP* assim como nos genes *VDE*, corroborando a ideia de que estes efeitos ambientais de fato influenciam a biossíntese dos carotenoides em *P. tricornutum*. Em relação as

perspectivas futuras, é de grande importância explorar e caracterizar a via biossintética da fucoxantina para identificar as enzimas envolvidas que ainda não foram descobertas e a especificidade de suas reações. Dentro deste contexto, sugere-se quantificar as respectivas proteínas para se obter os dados de expressão gênica, testar as hipóteses propostas por Lohr e Wilhelm e Dambek et al. e fazer uma análise mais detalhada dos teores de pigmentos encontrados em diatomáceas.

2.6 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos (mestrado junto ao PPGAQI/UFSC). Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC/CGTS/SETEC, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

2.7 REFERÊNCIAS

- [1] S. Scala, C. Bowler, Molecular insights into the novel aspects of diatom biology, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001) 1666-1673. [doi:10.1007/PL00000804](https://doi.org/10.1007/PL00000804).
- [2] P.J. Lopez, J. Desclés, A.E. Allen, C. Bowler, Prospects in diatom research, *Curr. Opin. Biotech.* 16 (2005) 180-186. [doi:10.1016/j.copbio.2005.02.002](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.002).
- [3] K.J.M. Mulders, P.P. Lamers, D.E. Martens, R.H. Wiiffels, Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities, *J. Phycol.* 50 (2014) 229-242. [doi:10.1111/jpy.12173](https://doi.org/10.1111/jpy.12173).
- [4] S. Coesel, M. Oborník, J. Varela, A. Falciatore, C. Bowler, Evolutionary origins and functions of the carotenoid biosynthetic pathway in marine diatoms, *PLoS One* 3 (2008) 1-16. [doi:10.1371/journal.pone.0002896](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002896).
- [5] P. Kuczynska, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, Photosynthetic Pigments in Diatoms, *Mar. Drugs* 13 (2015) 5847-5881. [doi:10.3390/md13095847](https://doi.org/10.3390/md13095847).
- [6] A. De Martino, A. Meichenin, J. Shi, K.H. Pan, C. Bowler, Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) accessions, *J. Phycol.* 43 (2007) 992-1009. [doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x).
- [7] C. Bowler et al. *Phaeodactylum tricorutum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes, *Nature* 456 (2008) 239-244. [doi:10.1038/nature07410](https://doi.org/10.1038/nature07410).

- [8] S. Xia, K. Wang, L. Wan, A. Li, Q. Hu, C. Zhang, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*, *Mar. Drugs* 11 (2013) 2667-2681. [doi:10.3390/md11072667](https://doi.org/10.3390/md11072667).
- [9] Y. Liu, J. Zheng, Y. Zhang, Z. Wang, Y. Yang, M. Bai, Y. Dai, Fucoxanthin Activates Apoptosis via Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway and Suppresses Invasion and Migration by Restriction of p38-MMP-2/9 Pathway in Human Glioblastoma Cells, *Neurochem. Res.* 41 (2016) 2728-2751. [doi:10.1007/s11064-016-1989-7](https://doi.org/10.1007/s11064-016-1989-7).
- [10] K.A.M. Andrade, C. Lauritano, G. Romano, A. Ianora, Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties, *Mar. Drugs* 16 (2018) 1-17. [doi:10.3390/md16050165](https://doi.org/10.3390/md16050165).
- [11] M. Lohr, C. Wilhelm, Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model, *Planta* 212 (2001) 382-391. [doi:10.1007/s004250000403](https://doi.org/10.1007/s004250000403).
- [12] M. Dambek, U. Eilers, J. Breitenback, S. Steiger, C. Büchel, G. Sandmann, Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricorutum*, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 5607-5612. [doi:10.1093/jxb/ers211](https://doi.org/10.1093/jxb/ers211).
- [13] M. Ragni, M.R. D'alcalá, Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricorutum*: Pigment content, *J. Plankton Res.* 29 (2007) 141-156. [doi:10.1093/plankt/fbm002](https://doi.org/10.1093/plankt/fbm002).
- [14] A. Nikolaou, P. Hartmann, A. Sciandra, B. Chachuat, O. Bernard, Dynamic coupling of photoacclimation and photoinhibition in a model of microalgae growth, *J. Theor. Biol.* 390 (2016) 61-72. [doi:10.1016/j.jtbi.2015.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.11.004).
- [15] A. Gelzinis, V. Buktus, E. Songaila, R. Augulis, A. Gall, C. Büchel, B. Robert, D. Abramavicius, D. Zigmantas, L. Valkunas, Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex, *Biochim. Biophys. Acta* 1847 (2015) 241-247. [doi:10.1016/j.bbabi.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.11.004).
- [16] T.G. Owens, P.G. Falkowski, T.E. Whitledge, Diel periodicity in cellular chlorophyll content in marine diatoms, *Mar. Biol.* 59 (1980) 71-77. [doi:10.1007/BF00405456](https://doi.org/10.1007/BF00405456).
- [17] T. Anning, H.L. MacIntyre, S.M. Pratt, P.J. Sammes, S. Gibb, R.J. Geider, Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*, *Limnol. Oceanogr.* 45 (2000) 1807-1817. [doi:10.4319/lo.2000.45.8.1807](https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1807).

- [18] M. Nymark, K.C. Valle, T. Brembu, K. Hancke, P. Winge, K. Andresen, G. Johnsen, A.M. Bones, Molecular and Photosynthetic Responses to Prolonged Darkness and Subsequent Acclimation to Re-Illumination in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*, PLoS One 8 (2013) 1-19. [doi: 10.1371/journal.pone.0058722](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058722).
- [19] M. Lohr, C. Wilhelm, Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle, Pnas 96 (1999) 8784-8789. [doi:10.1073/pnas.96.15.8784](https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8784).
- [20] R. Goss, B. Lepetit, Biodiversity of NPQ, J. Plant Physiol. 172 (2015) 13-32. [doi:10.1016/j.jplph.2014.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004).
- [21] A. Falciatore, M.R. d'Alcalà, P. Croot, C. Bowler, Perception of Environmental Signals by a Marine Diatom, Science 346 (2000) 2363-2366. [doi:10.1126/science.288.5475.2363](https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2363).
- [22] F.A. Depauw, A. Rogato, M.R. d'Alcalà, A. Falciatore, Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms, J. Exp. Bot. 63 (2012) 1575-1591. [doi:10.1093/jxb/ers005](https://doi.org/10.1093/jxb/ers005).
- [23] P.R. Walne, Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*, Fish. Invest. 25 (1966) 1-53.
- [24] C. Klughammer, U. Schreiber, Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method, PAN 1 (2008) 27-35.
- [25] J.R.F. Malapascua, C.G. Jerez, M. Sergejevová, F.L. Figueroa, J. Masojídek, Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques, Aquat. Biol. 22 (2014) 123-140. [doi:10.3354/ab00597](https://doi.org/10.3354/ab00597).
- [26] G. Johnsen, E. Sakshaug, Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulseamplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry, J. Phycol. 43 (2007) 1236-1251. [doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00422.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00422.x).
- [27] J.D. Strickland, T.R. Parsons, A Practical Handbook of Seawater Analysis. Pigment analysis. Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids, Fish Resource Building, Canada Bulletin, 1972, pp. 185-199.
- [28] S.W. Jeffrey, G.F. Humphrey, New spectrophotometric equation for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural populations, Biochem. Physiol. Pflanzen 167 (1975) 191-194. [doi:10.1016/s0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(17)30778-3).
- [29] J.I. Carreto, J.A. Catoggio, An indirect method for the rapid estimation of carotenoid contents in *Phaeodactylum tricorutum*: Possible application to other marine algae, Mar. Biol. 40 (1977) 109-116. [doi:10.1007/BF00396255](https://doi.org/10.1007/BF00396255).

- [30] M. Siaut, M. Heijde, M. Mangogna, A. Montsant, S. Coesel, A. Allen, A. Manfredonia, A. Falciatore, C. Bowler, Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricorutum*, *Gene* 406 (2007) 1-2. [doi:10.1016/j.gene.2007.05.022](https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.05.022).
- [31] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1101-1108. [doi:10.1038/nprot.2008.73](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73).
- [32] H. Wagner, T. Jakob, C. Wilhelm, Balancing the energy flow from captured light to biomass under fluctuating light conditions, *New Phytol.* 169 (2006) 95-108. [doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01550.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01550.x).
- [33] J. Masojídek, G. Torzillo, M. Koblizek, Photosynthesis in microalgae, in: A. Richmond, Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*, second ed, Wiley-Blackwell, Oxford, 2013, pp. 21-36.
- [34] J. Lavaud, Fast Regulation of the Photosynthesis in Diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology, *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 1 (2007) 267-287.
- [35] J. Lavaud, A.C. Materna, S. Sturm, S. Vugrinec, P.G. Kroth, Silencing of the Violaxanthin De-Epoxidase Gene in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum* Reduces Diatoxanthin Synthesis and Non-Photochemical Quenching, *PLoS One* 7 (2012) 1-13. [doi:10.1371/journal.pone.0036806](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036806).
- [36] P.J. Ralph, R. Gademann, Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity, *Aquat. Bot.* 3 (2005) 222-237. [doi:10.1016/j.aquabot.2005.02.006](https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2005.02.006).
- [37] D.G. Durnford, Structure and Regulation of Algal Light-Harvesting Complex Genes, in: J.A. Raven, A.W.D. Larkum, S.E. Douglas, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Springer Science and Business Media Dordrecht, Illinois, 2003, pp. 63-77.
- [38] M. Nymark, K.C. Valle, T. Brembu, K. Hancke, P. Winge, K. Andresen, G. Johnsen. A.M. Bones, An Integrated Analysis of Molecular Acclimation to High Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *PLoS One*, 4 (2009) 1-14. [doi:10.1371/journal.pone.0007743](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007743).
- [39] C. Faraloni, G. Torzillo, Synthesis of Antioxidant Carotenoids in Microalgae in Response to Physiological Stress, 9 (2017) 143-157. [doi:10.5772/67843](https://doi.org/10.5772/67843)
- [40] C. Wang, J. Kim, S. Kim, Synthetic Biology and Metabolic Engineering for Marine Carotenoids: New Opportunities and Future Prospects, *Mar. Drugs* 12 (2014) 4810-4832. [doi:10.3390/md12094810](https://doi.org/10.3390/md12094810).

- [41] W. Fu, G. Paglia, M. Magnúsdóttir, E. Steinarsdóttir, S. Gudmundsson, B. Pálsson, O.S. Andrésón, S. Brynjólfsson, Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga *Dunaliella salina*, *Microb. Cell Fact.* 13 (2014) 1-9. [doi:10.1186/1475-2859-13-3](https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-3).
- [42] P. Jahns, D. Latowski, K. Strzalka, Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 3-14. [doi:10.1016/j.bbabi.2008.09.013](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.09.013).
- [43] J.J. Huang, S. Lin, W. Xu, P.C.K. Cheung, Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 597-618. [doi:10.1016/j.biotechadv.2017.05.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.001).
- [44] U. Eilers, A. Bikoulis, J. Breitenback, C. Büchel, G. Sandmann, Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricorutum*, 28 (2016) 123-129. [doi:10.1007/s10811-015-0583-8](https://doi.org/10.1007/s10811-015-0583-8).
- [45] W. Su, T. Jakob, C. Wilhelm, The impact of nonphotochemical quenching of fluorescence on the photon balance in diatoms under dynamic light conditions, *J. Phycol.* 48 (2012) 336-346. [doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01128.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01128.x).
- [46] N. Domingues, A.R. Matos, J.M. Silva, P. Cartaxana, Response of the Diatom *Phaeodactylum tricorutum* to Photooxidative Stress Resulting from High Light Exposure, *PLoS One*, 7 (2012) 1-6. [doi:10.1371/journal.pone.0038162](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038162).
- [47] V. Giovagnetti, A.V. Ruban, Detachment of fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding protein (FCP) antenna is not involved in the acclimative regulation of photoprotection in the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Biochim. Biophys. Acta* 1858 (2017) 218-230. [doi:10.1016/j.bbabi.2016.12.005](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.12.005).

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ALLEN, A. E. et al. Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10438-10443, 2008. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711370105>.

ANDRADE, K. A. M. et al. Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties. **Marine Drugs**, v. 16, n. 165, p. 1-17, 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/md16050165>.

ANNING, T. et al. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Limnology and Oceanography**, v. 45, n. 8, p. 1807-1817, 2000. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1807>.

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

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2004.04.0094>.

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. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 516-529, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(99\)00191-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00191-x).

BERTRAND, M. Carotenoid biosynthesis in diatoms. **Photosynthesis Research**, v. 106, n. 1-2, p. 89-102, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-010-9589-x>.

BORGES, M. et al. Integration of consumer-targeted microalgal production with marine fish effluent biofiltration – a strategy for mariculture sustainability. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 3, p. 187-197, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-005-4842-y>.

BOWLER, C. et al. The *Phaeodactylum tricornutum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, p. 239-244, 2008. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07410>.

- CHALLABATHULA, D.; ZHANG, Q.; BARTELS, D. Protection of photosynthesis in desiccation-tolerant resurrection plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 227, p. 84-92, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.002>.
- CHAN, M. et al. Characterization, extraction and purification of lutein produced by na indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 24-31, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.11.017>.
- CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, n. 229, p. 53-62, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>.
- CHRISTIAN, M. et al. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. **Genetics**, v. 186, n. 2, p. 757-761, 2010. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.110.120717>.
- CHUYEN, V. H.; EUN, J. Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 12, p. 2600-2610, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1063477>.
- COESEL, S. et al. Evolutionary Origins and Functions of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Marine Diatoms. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. 1-16, 2008. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002896>.
- COSTA, B. S. et al. Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 483-493, 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers340>.
- DAMBEK, M. et al. Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 15, p. 5607-5612, 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers211>.
- DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1163-1174, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>.

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

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x>.

DEPAUW, F. A. et al. Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 4, p. 1575-1591, 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers005>.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000600050>.

DILER, I.; DILEK, K. Significance of Pigmentation and Use in Aquaculture. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 2, p. 97-99, 2002.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1258096>.

FALCIATORE, A. et al. Perception of Environmental Signals by a Marine Diatom. **Science**, v. 288, n. 5475, p. 2363-2366, 2000. <http://dx.doi.org/10.1126/science.288.5475.2363>.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **An Introduction to Photosynthesis in Aquatic Systems**. In: FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. (Eds.). *Aquatic Photosynthesis*. 2. ed. Princeton: Princeton University, 2007. Cap. 1. p. 1-43.

FARALONI, C.; TORZILLO, G. Xanthophyll cycle induction by anaerobic conditions under low light in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 5, p. 1457-1471, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-9986-6>.

FRANK, H. A.; COGDELL, R. J. Carotenoids in Photosynthesis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 63, n. 3, p. 257-264, 1996. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022.x>.

FU, W. et al. Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga *Dunaliella salina*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 3, p. 1-9, 2014. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-13-3>.

GELZINIS, A. et al. Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1847, n. 2, p. 241-247, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.11.004>.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396-1412, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>.

GOSS, R.; LEPETIT, B. Biodiversity of NPQ. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 13-32, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004>.

HOLDSWORTH, E. S. Effect of growth factors and light quality on the growth, pigmentation and photosynthesis of two diatoms, *Thalassiosira gravida* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Biology**, v. 86, n. 3, p. 253-262, 1985. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00397512>.

KADONO, T. et al. Effect of na Introduced Phytoene Synthase Gene Expression on Carotenoid Biosynthesis in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5334-5357, 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/md13085334>.

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. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3441-x>.

KROTH, P. G. Genetic transformation: A tool to study protein targeting in diatoms. **Methods in Molecular Biology**, v. 390, p. 257-267, 2007.

KROTH, P. G. et al. Genome editing in diatoms: achievements and goals. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 10, p. 1401-1408, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-018-2334-1>.

KUCZYNSKA, P.; JEMIOLA-RZEMINSKA, M.; STRZALKA, K. Photosynthetic Pigments in Diatoms. **Marine Drugs**, v. 13, n. 9, p. 5847-5881, 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/md13095847>.

KUMAR, K. S. et al. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 329-352, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>.

LAMERS, P. P. et al. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 11, p. 631-638, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.002>.

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

LI, G.; TALMY, D.; CAMPBELL, D. A. Diatom growth responses to photoperiod and light are predictable from diel reductant generation. **Journal of Phycology**, v. 53, n. 1, p. 95-107, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1111/jpy.12483>.

LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 47-65, 1999.

LIU, Y. et al. Fucoxanthin Activates Apoptosis via Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway and Suppresses Invasion and Migration by Restriction of p38-MMP-2/9 Pathway in Human Glioblastoma Cells. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 10, p. 2728-2751, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-016-1989-7>.

LOHR, M.; WILHELM, C. Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 15, p. 8784-8789, 1999.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.15.8784>.

LOHR, M.; WILHELM, C. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. **Planta**, v. 212, n. 3, p. 382-391, 2001. <http://dx.doi.org/10.1007/s004250000403>.

LOPEZ, P. J. et al. Prospects in diatom research. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 180-186, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.002>.

MACINTYRE, H. L.; KANA, T. M.; GEIDER, R. J. The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. **Trends in Plant Science**, v. 5, n.1, p. 12-17, 2000.

MAGNOTTI, C. et al. Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. Part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 8, p. 1-9, 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12691>.

MANSOURI, H.; HAJIZADEH, F. Interaction Effects of Salinity, High Light, Intensity and Acetate on Growth and Pigment Production on *Scenedesmus obliquus*. **Iranian Journal of Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 1821-1826, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s40995-017-0441-4>.

McCLURE, D. D. et al. An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. **Algal Research**, v. 29, p. 41-48, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.015>.

MENEZES, R. S. et al. Culture medium influence on growth, fatty acid, and pigment composition of *Choricystis minor* var. *minor*: a suitable microalga for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2679-2686, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0828-1>.

MIKAMI, K.; HOSOKAWA, M. Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13763-13781, 2013. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140713763>.

MULDERS, K. J. M. et al. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 229-242, 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/jpy.12173>.

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.11.004>.

NYMARK, M. et al. Molecular and Photosynthetic Responses to Prolonged Darkness and Subsequent Acclimation to Re-Illumination in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1-19, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058722>.

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.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00405456>.

PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 255-266, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>.

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. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>.

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.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.105>.

PREMVARDHAN, L. et al. The Charge-Transfer Properties of the S2 State of Fucoxanthin in Solution and in Fucoxanthin Chlorophyll-a/c2 Protein (FCP) Based on Stark Spectroscopy and Molecular-Orbital Theory. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 37, p. 11838-11853, 2008. <http://dx.doi.org/10.1021/jp802689p>.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.

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.
<http://dx.doi.org/10.1093/plankt/fbm002>.

RECHT, L. et al. Metabolite Profiling and Integrative Modeling Reveal Metabolic Constraints for Carbon Partitioning under Nitrogen Starvation in the Green Algae *Haematococcus pluvialis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30387-30403, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.555144>.

ROHMER, M. et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochemical Journal**, v. 295, n. 2, p. 517-524, 1993. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2950517>.

ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Natural Product Reports**, v. 16, n. 5, p. 565-574, 1999. <http://dx.doi.org/10.1039/A709175C>.

SANDMANN, G. Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. **Physiologia Plantarum**, v. 116, n. 4, p. 431-440, 2002. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160401.x>.

SCALA, S.; BOWLER, C. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 11, p. 1666-1673, 2001. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000804>.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 6, p. 230-240, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00044-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00044-2).

SIAUT, M. et al. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricorutum*. **Gene**, v. 406, n. 1-2, p. 23-35, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2007.05.022>.

SIMOPOULOS, A. P. The ω -6/ ω -3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, p. 131-134, 2008.

SOLOVCHENKO, A.; NEVEROV, K. Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. **Photosynthesis Research**, v. 133, n. 1-3, p. 31-47, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-017-0358-y>.

SPOLAORE, P. et al. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.101.87>.

STRZEPEK, R. F.; HARRISON, P. J. Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. **Nature**, v. 431, p. 689-692, 2004.

TOCHER, D. R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 717-732, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>.

TORZILLO, G. et al. Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 1-2, p. 127-136, 2003. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1023854904163>.

VALLE, K. C. et al. System Responses to Equal Doses of Photosynthetically Usable Radiation of Blue, Green, and Red Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-37, 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0114211>.

VIADERO Jr., R. C. et al. Effluent and production impacts of flow-through aquaculture operations in West Virginia. **Aquacultural Engineering**, v. 33, n. 4, p. 258-270, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.02.004>.

WANG, C.; KIM, J.; KIM, S. Synthetic Biology and Metabolic Engineering for Marine Carotenoids: New Opportunities and Future Prospects. **Marine Drugs**, v. 12, n. 9, p. 4810-4832, 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/md12094810>.

WEN, Z.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 4, p. 273-294, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00051-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00051-X).

WIN, T. T. et al. Algal Biofertilizers and Plant Growth Stimulants for Sustainable Agriculture. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 203-210, 2018. <http://dx.doi.org/10.1089/ind.2018.0010>.

XIA, S. et al. Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 7, p. 2667-2681, 2013. <http://dx.doi.org/10.3390/md11072667>.

XIA, S. et al. Production of fucoxanthin, chrysolaminarin, and eicosapentaenoic acid by *Odontella aurita* under different Nitrogen supply regimes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 126, n. 6, p. 723-729, 2018.

YI, Z. et al. Chemical Mutagenesis and Fluorescence-Based High-Throughput Screening for Enhanced Accumulation of Carotenoids in a Model Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, p. 1-16, 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/md16080272>.

YOSHINAGA, R. et al. Characterization of iron-responsive promoters in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Genomics**, v. 16, p. 55-62, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2014.01.005>.

ZHOU, X. et al. *Arabidopsis* OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. 3558-3563, 2015. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1420831112>.