HELENA DIAS MÜLLER VILLELA

**Utilização das Técnicas de Engenharia Genética e
Bioquímica em *Chlamydomonas reinhardtii* Visando
o Aumento da Produção de Lipídeos para Obtenção
de Biocombustível**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica).*

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2014

Dedico esta dissertação à minha família, em especial ao meu pai e à minha mãe, que dedicam suas vidas às de seus filhos.

AGRADECIMENTOS

À turma de Biologia 2006/02 UFRJ, em especial às minhas grandes amigas de graduação Luiza e Sara pelos momentos indescritíveis que vivemos juntas na faculdade e por tudo que se seguiu depois dela: amizade, afinidade e respeito;

Aos meus amigos da época de colégio Binha, Lica, Dani, Lene, Carol, Nanda, Jacque, Juju, Ju, Amandinha, Mari, Boca, Tijo, Plugue, Leco, Lulu, e à todos os outros amigos de MV1 e Santa Mônica que de alguma maneira passaram pela minha vida durante esse período de formação;

Aos amigos de infância Lol, Mimi, Pris, Dani, Debinha, Fran e Manu, pela amizade que ainda perdura;

Aos amigos de Seven Springs Ju, Rô, Diego, Dri, Gui, João e Vanessa, pela fase maravilhosa que passamos juntos e por conseguirmos manter nossa amizade independente da distância ou do tempo;

Aos amigos emprestados e que agora são também meus, Dindinha, Leda, Cirilo, Márcio, Flávia, Kildare, Ana, Susana, Glauber, Rada, Glauco, Danielle, Fabiano, Júnior, Vivi, e todos que não cito nomes, mas que sabem sua importância;

Aos amigos da USP Valdir, Gabi, Pererê, Fefê, Lu, Karlinha, Kleber, Fabrício, Erikinha, Fufu, Augusto, Tio, Tati, e à tantos os que não pude citar os nomes, mas que contrubuíram para minha formação;

Aos colegas de laboratório Aline, Ângela, Cíntia, Dina, Lili, Erechim, Erika, Lu, Tati, Amanda, Víctor e Michele pela convivência e amizade durante todo o período do mestrado;

Aos técnicos do laboratório, Ed, Sandrinha e Leo, que além de me auxiliarem em minha pesquisa também considero grandes amigos;

Às minhas companheiras de casa desde sempre Aline e Érika, que apesar das dificuldades da convivência sempre foram muito queridas e são pessoas que vou levar pra vida toda;

Aos professores que me supervisionaram no PAE, Manuel Troyano e Suely Gomes, com quem aprendi muito;

À todos os professores que de alguma maneira auxiliaram na minha formação, professores Regina, Priscila, Frederico Gueiros, Alícia Kowaltowski, Maurício Baptista, Patrícia Matai, Gláucia Souza, Ana Maria Carmona, Armando Casas Mollano, entre tantos outros;

Ao pessoal do LEMM, Raquel, Alexandre, Juliano, Hugo, Deborinha, Regina, Edir, Flávia, Henrique e Caren, que acrescentaram muito em minha formação durante minha graduação e por quem tenho muito carinho;

Aos integrantes do Laboratório Firmino Torres de Castro, em especial ao professor Edson Rondinelli, à professora Rosane Silva e à Cíntia Simas, com quem iniciei minha carreira científica;

Ao técnico do microscópio confocal Henrique Rofatto Instituto Butantã e à aluna de doutorado Karina Giannotti pela paciência e ajuda (projeto Fapesp número 00/11624-5);

Ao professor Jean Pierre Schatzmann Peron e aos seus alunos Cristiano Rossato e Wesley Brandão pela disponibilidade do citômetro de fluxo e pela boa vontade em ajudar (projeto Fapesp 2011/18703-2);

À todos os integrantes do laboratório do professor Richard Sayre, onde aprimorei meus conhecimentos e obtive experiência indispensável para a realização desse trabalho;

Aos companheiros antárticos Mi, Fran, Bruna, César e Eric, com quem compartilhei uma das experiências mais fantásticas da minha vida, além de muitos momentos de descontração e de trabalho árduo;

Aos funcionários do Instituto de Química de São Paulo, em especial aos funcionários da secretaria de pós-graduação pela paciência e ajuda em todos os momentos em que precisei;

À Angela, não só pela orientação em todos os passos deste projeto, mas também pela amizade e companheirismo;

Às famílias que me foram emprestadas Dona Leila, Seu Carlindo, Vera, Andrea, Chico, Luane, Igor, Vinícius, Tia Jo e Henrique, Tia Jose, Cristal, Nick e Jade;

Ao Leo, pelo carinho, paciência, amizade e compreensão durante os muitos momentos em que se fizeram necessários;

À minha família. À todos os meus tios, em especial à minha tia Mariana que foi como uma mãe. Aos meus primos, em especial ao Didigo, Tatá, Nina, Bruno, André, Cesinha, Julinho, Binho, Kaká, Pedro, Carol e Caio com quem eu sempre tive mais contato. Aos meus irmãos Fefo e Xande, que sempre foram meu espelho e minhas melhores influências na vida e no trabalho.

Ao meu pai Ciro, por todo o amor, pelo incentivo incondicional à minha carreira desde sempre e por ser o homem mais íntegro que já conheci. À minha mãe Cristina por ser a mulher mais doce e alegre que pode existir e por ter me dado todo o suporte para que eu pudesse trilhar meu caminho;

Ao Pio, que desempenhou papel de amigo, pai, irmão, professor, e tantos outros papéis durante essa etapa da minha vida. Que confiou em mim mesmo quando eu não merecia e me abriu todas as portas que poderia abrir. Admiração e carinho são as palavras que predominam quando penso nessa relação. Obrigada por ter sido muito mais do que um orientador pra mim;

Às agências financiadoras FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”
Sócrates

RESUMO

Villela, H.D.M. **Utilização das Técnicas de Engenharia Genética e Bioquímica em *Chlamydomonas reinhardtii* Visando o Aumento da Produção de Lipídeos para Obtenção de Biocombustível**. 2014. 139p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os impactos ambientais causados pela queima dos combustíveis fósseis e pela sua manipulação, aliados ao crescente preço dos combustíveis, têm fomentado a procura de novos recursos renováveis e o desenvolvimento de novas tecnologias que suportem as necessidades desse mercado. Os biocombustíveis são recursos biodegradáveis e renováveis, que vêm se revelando uma alternativa economicamente viável. No entanto, a atual geração de biocombustíveis possui alguns pontos negativos, tais como: utilização de solos férteis e competição com a indústria de alimentos, uma vez que utiliza culturas como soja, milho e cana-de-açúcar, produtos de extrema importância econômica para seus países produtores. Por estes motivos, há um crescente interesse em explorar outras matérias-primas possíveis, em especial as voltadas exclusivamente para a geração de energia. Neste contexto, as microalgas vêm se mostrando uma opção bastante interessante. Estes organismos apresentam um alto potencial para tal, pois possuem alta taxa de crescimento e capacidade de produzir grande quantidade de óleo. Além disso, a produção do biocombustível por estes organismos pode ser otimizada tanto pela modificação das condições de cultivo (engenharia bioquímica), como através da manipulação genética das linhagens (engenharia genética). Neste trabalho, ambas as estratégias foram utilizadas com o intuito de se aumentar a quantidade de lipídeo produzido pela linhagem CC424 da microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*. A via metabólica escolhida para a manipulação genética foi o ciclo do glioxilato, sendo as duas enzimas-chave desse ciclo, isocitrato liase (icl) e malato sintase (ms), os alvos. O plasmídeo pSL18 foi utilizado como vetor da transformação nas microalgas. Seis tipos de linhagens transformantes foram obtidas: duas delas subexpressando os genes *icl* e *ms* separadamente, duas subexpressando esses genes e duas contendo duplas transformações, ou seja, uma delas subexpressando ambos os

genes ao mesmo tempo e a outra superexpressando os mesmos. Quando se subexpressou ambas as enzimas ao mesmo tempo, houve um aumento significativo na quantidade de lipídeos neutros da célula. Além disso, essa linhagem transgênica foi submetida à escassez de nitrogênio, o que acentuou ainda mais esse resultado. Enquanto em meio normal a diferença entre a quantidade de lipídeos foi de 1,5 vezes, em escassez de nitrogênio essa diferença foi de aproximadamente 3 vezes, corroborada pela diferença nos níveis de expressão gênica, que também foi em torno de 3 vezes. Além disso, a linhagem transgênica também mostrou um aumento em cada um dos ácidos graxos analisados individualmente, revelando uma grande quantidade de todos os tipos de C16 e C18, ácidos graxos importantes para que o biodiesel se adeque ao regulamento da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Apesar de maior quantidade de lipídeos em relação à linhagem selvagem, a nova linhagem transgênica Dupla-ICL-MS-anti não mostrou nenhum efeito deletério crítico. Tanto a produção de biomassa, quanto a quantidade de clorofila a, proteínas totais e carboidratos totais se mantiveram estáveis após a introdução da mutação. Esses resultados sugerem que as enzimas do ciclo do glioxilato, sabidamente ligadas ao catabolismo de ácidos graxos, podem ser utilizadas como alvos promissores para a otimização de linhagens já utilizadas comercialmente na produção de biodiesel.

Palavras-chave: Lipídeos, microalgas, engenharia genética, ciclo do glioxilato, biocombustível, *Chlamydomonas reinhardtii*.

ABSTRACT

Villela, H.D.M. **Use of Genetic and Biochemical Engineering in *Chlamydomonas reinhardtii* aiming the increase of the lipid level for biofuel production.** 2014. 139p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The environmental impacts caused by gases emitted from burning fossil fuels and their manipulation, combined with rising fuel prices, has stimulated demand for new renewable resources and developing new green technologies that support the industry and market needs. Biofuels are biodegradable and renewable resources, which come out to be an economically viable alternative. However, the current generation of biofuels has some disadvantages, such as: use of fertile soils and competition with the food industry, once it uses crops such as soybeans, corn and sugar cane, products of extreme economic importance to the producing countries. For these reasons, there is a growing interest in exploring other possible raw materials, especially those that are geared exclusively for power generation. In this context, microalgae have shown to be a very interesting option. These organisms have a high potential because they have fast growth rate and the ability to produce large amounts of oil. In addition, biofuel production by these organisms can be optimized for both the modification of culture conditions (biochemical engineering), and through the genetic manipulation of microalgae strains (genetic engineering). In this work, the two strategies have been used in order to increase the amount of lipid produced by the strain CC424 from the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. The metabolic route chosen for genetic manipulation is the glyoxylate cycle, and the two key enzymes of this cycle, isocitrate lyase (*icl*) and malate synthase (*ms*), the targets. The plasmid pSL18 was used as a vector of transformation in the microalgae. Six types of transformant strains were obtained, two of them overexpressing the *ms* and *icl* genes separately, two underexpressing these genes and two double transformations, one of them overexpressing both genes at the same time the other one underexpressing them. The strain underexpressing both enzymes at the same time, showed a significant increase in the amount of neutral lipids. In this

mutant, the shortage of nitrogen led to an even greater increase in these lipids. While in normal media the difference between the amount of lipids was 1.5 times, under nitrogen starvation the difference was approximately 3 times, corroborated by the difference in gene expression levels, which was also about 3 times. Moreover, the mutant strain also showed an increase in each of the individual fatty acids analyzed, revealing a large amount in all kinds of C16 and C18 fatty acids, important for biodiesel that suits the regulation of *Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis*. Although the mutant *Dupla-ICL-MS-anti* produces higher amounts of lipids compared to the wild type, the strain showed no critical negative effects. Both the production of biomass and the amount of chlorophyll a, total protein and total carbohydrates remained stable after the introduction of the mutation. These results suggest that the enzymes of the glyoxylate cycle, which are linked to the catabolism of fatty acids, can be used as promising targets for the optimization of strains already used commercially in the production of biodiesel.

Keywords: Lipids, microalgae, genetic engineering, glyoxylate cycle, biofuels, *Chlamydomonas reinhardtii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Oferta mundial de energia por fonte.....	19
Figura 2	Oscilação do preço do petróleo (óleo bruto), por interferência de questões políticas dos países com maior influência e com as reservas mais expressivas.....	20
Figura 3	Adaptação do diagrama original de Hubbert (1956) mostrando a predição do pico do petróleo.....	22
Figura 4	Nikolaus August Otto, Rudolph Diesel e Henry Ford.....	25
Figura 5	José Walter B. Vidal e Urbano Ernesto Stumpf.....	28
Figura 6	Matriz energética brasileira para combustíveis veiculares.....	30
Figura 7	Evolução dos biocombustíveis no Brasil.....	30
Figura 8	(A) Fórmula geral de um triacilglicerol, (B) Duas moléculas diferentes de TAG..	35
Figura 9	Biossíntese global de TAG.....	38
Figura 10	Esquema do craqueamento de óleo vegetal.....	41
Figura 11	Esquema geral da reação de esterificação.....	42
Figura 12	Esquema geral da reação de transesterificação.....	43
Figura 13	Esquema da transesterificação de óleo vegetal com a utilização de metanol.....	43
Figura 14	Principais matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil.....	45
Figura 15	Esquema da microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	60
Figura 16	Esquema do ciclo do glioxilato.....	63
Figura 17	Esquema da interação entre as moléculas do ciclo do glioxilato, ciclo de Krebs e a gliconeogênese.....	64
Figura 18	Gráficos da curva de crescimento da linhagem transgênica de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ao longo de oito dias.....	79
Figura 19	Mapa do plasmídeo pSL18, com os sítios de restrição únicos.....	82
Figura 20	(A) Digestão do plasmídeo pSL18-ICL com as enzimas de restrição KpnI e NdeI, (B) Linearização do plasmídeo (C) Esquema do plasmídeo.....	83
Figura 21	(A) Digestão do plasmídeo pSL18-MS com as enzimas de restrição KpnI e NdeI, (B) Linearização do plasmídeo (C) Esquema do plasmídeo.....	86
Figura 22	(A) Digestão do plasmídeo pSL18-ICLanti com as enzimas de restrição KpnI e NdeI, (B) Linearização do plasmídeo (C) Esquema do plasmídeo.....	88

Figura 23	(A) Digestão do plasmídeo pSL18-MSanti com as enzimas de restrição KpnI e NdeI, (B) Linearização do plasmídeo (C) Esquema do plasmídeo.....	91
Figura 24	Esquema da transformação genética pelo método de microesferas de vidro.....	92
Figura 25	(A) Colônias transgênicas crescendo em placas contendo paromomicina, (B) Exemplos de colônias repassadas para novas placas com antibiótico.....	94
Figura 26	Géis de agarose com o produto de PCR das colônias.....	96
Figura 27	Gráficos baseados nos valores de fluorescência emitidos pelas células marcadas com o <i>Nile Red</i>	99
Figura 28	Gel de agarose 1.2% mostrando a ausência do plasmídeo pSL18MSanti em CC424 e a presença do mesmo no transgênico.....	102
Figura 29	Gel de agarose 1.2% comprovando a eficiência da digestão pela enzima DNase.....	103
Figura 30	Confirmação da integridade do RNA que pode ser visualizado na imagem do gel apresentada pelo equipamento Bioanalyzer.....	105
Figura 31	Gel de agarose 1.2% mostrando a presença de cDNA pelo anelamento dos primers confeccionados para o ensaio de PCR em tempo real quantitativo.....	106
Figura 32	Níveis de expressão gênica detectados no ensaio de PCR em tempo real comparativo ($\Delta\Delta CT$).....	108
Figura 33	Curvas de crescimento das linhagens transgênica e selvagem em meio (A) TAP, (B) TAP com escassez de nitrogênio.....	109
Figura 34	Quantificação de ácidos graxos representados no cromatograma gerado pelo CG/EM.....	110
Figura 35	Variação de (A) Clorofila a, (B) proteínas solúveis totais e (C) carboidratos solúveis totais entre a linhagem selvagem CC424 e a linhagem transgênica Dupla-ICL-MS-anti.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Empresas que possuem o Selo Combustível.....	33
Tabela 2	Especificações do biodiesel a ser comercializado.....	34
Tabela 3	Culturas oleaginosas com potencial para produção de óleo vegetal e biodiesel, e referência média de produtividade de óleo por hectare.....	45
Tabela 4	Quantidade percentual de lipídeo de algumas espécies de microalga.....	48
Tabela 5	Produtividade de fontes importantes de biodiesel.....	48
Tabela 6	Algumas modificações genéticas em diversas espécies que obtiveram resultados positivos quanto ao aumento de lipídeo.....	52
Tabela 7	Genomas de algas publicados.....	54
Tabela 8	Alguns projetos de sequenciamento em andamento.....	54
Tabela 9	Primers utilizados para a PCR convencional com objetivo de confirmar os clones positivos.....	72
Tabela 10	Primers utilizados para a confirmação da síntese de cDNA pela técnica de RT-PCR.....	73
Tabela 11	Transgênicos conseguidos por confirmação de PCR convencional com cada uma das construções de interesse.....	97
Tabela 12	Quantificação e perfil de ácidos graxos da alga selvagem CC424 e da transgênica Dupla-ICL-MS-anti.....	111

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACL	ATP citrato liase
ACS	Acetil-CoA sintetase
ACP	Proteína transportadora de acil
AIE	Agência Internacional de Energia
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ARG7	Arginina succinato liase
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i>
cDNA	DNA codificador
CH₄	Gás metano
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CL	Corpos lipídicos
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
DGAT	Acil-CoA diacilglicerol acil-transferase
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Desvio padrão
DO	Densidade Óptica
dsRNA	<i>Double strand RNA</i>
DTT	Ditiorreitol
EDTA	Etileno diamina tetra acético
EUA	Estados Unidos da América
FAS	Complexo multienzimático da síntese de ácido graxo
FAO	<i>Food and Agriculture Organisation of the United Nations</i>
GEE	Gases do efeito estufa
GPAT	Acil-CoA glicerol-sn-3-fosfato acil-transferase
G3P	Glicerol-3-fosfato
icl	Isocitrato liase
IOS	<i>International Organization for Standardization</i>
KAS	Cetoacil-ACP sintase
KOAC	Acetato de potássio
LB	Lurina-Bertani
LPA	Lisofosfatidato

LPAT	Lisofosfatidil acil-transferase
ME	Enzima málica
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
ms	Malato sintase
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	NAD-fosfato-oxidase
NAOH	Hidróxido de sódio
NIT1	Nitrato Redutase
N2O	Óxido nitroso
OPEP	Organização dos Países Produtores de Petróleo
PA	Fosfatidato
PAP	Ácido fosfatídico
PASEP	Programa de Formação do Patrimônio do Servidor Público
PB	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietileno Glicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFC	Perfluorcarbonetos
PIS	Programa de Integração Social
PPM	Partes por milhão
PROÁLCOOL	Programa Nacional do Alcool
PRONAF	Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar
qRT-PCR	PCR em tempo real quantitativo
RE	Retículo endoplasmático
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNAi	RNA de interferência
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-PCR</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAG	Triacilglicerol
TAP	Tris-Acetato-Fosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Combustíveis derivados do Petróleo: cenário mundial, problemas e alternativas.....	18
1.2 Biocombustíveis: definição, tipos, panoramas mundial e nacional.....	23
1.2.1 A história dos biocombustíveis.....	24
1.2.2 Biocombustíveis no cenário mundial e nacional.....	27
1.2.3 Biodiesel: estrutura e biossíntese de triacilgliceróis (TAG).....	35
1.2.4 Biodiesel: a transformação do óleo vegetal em combustível.....	40
1.2.5 Biodiesel: fontes de triacilgliceróis.....	44
1.3 Algas.....	46
1.3.1 Microalgas para biodiesel: Espécies, vantagens, engenharia bioquímica e engenharia genética.....	47
1.3.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> como organismo modelo.....	57
1.4 O Ciclo do Glioxilato.....	62
2. OBJETIVOS.....	66
2.1 Objetivo principal.....	66
2.2 Objetivos específicos.....	66
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
3.1 Cultura e condições de crescimento de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	67
3.2 Análise das sequências das enzimas (isocitrato liase e malato sintase).....	67
3.3 Construção dos plasmídeos.....	67
3.4 Transformações em bactérias.....	68
3.5 Digestão dos plasmídeos transformados.....	69
3.6 Linearização com KpnI e purificação dos plasmídeos.....	70
3.7 Transformação genética das microalgas.....	70
3.8 Seleção de clones positivos através de PCR convencional.....	71
3.9 Análise da expressão gênica.....	72
3.9.1 Extração de RNA.....	72
3.9.2 Bioanalyzer.....	72
3.9.3 RT-PCR.....	72
3.9.4 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR).....	73
3.10 Análise fenotípica.....	73
3.10.1 Análise da quantidade de lipídeos neutros pela técnica de Nile Red.....	74
3.10.2 Extração e análise de ácidos graxos por CG-EM.....	74
3.10.3 Proteínas solúveis totais.....	76
3.10.4 Carboidratos solúveis totais	76

3.10.5	Clorofila a.....	76
3.11	Análise estatística.....	77
4.	RESULTADOS.....	78
4.1	Aspectos gerais da manutenção e cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	78
4.2	Construção das linhagens transgênicas.....	80
4.2.1	Superexpressão dos genes.....	80
4.2.2	Subexpressão dos genes.....	86
4.3	Transformação das algas.....	91
4.4	Screening de transgênicos com alto teor lipídico por marcação com <i>Nile Red</i>	97
4.5	Confirmação do duplo transgênico de subexpressão.....	101
4.6	Análise da expressão gênica de <i>isocitrato liase</i> e <i>malato sintase</i>	102
4.6.1	Extração de RNA e digestão do DNA presente.....	102
4.6.2	Verificação da Integridade do RNA por Bioanalyzer.....	104
4.6.3	Produção de cDNA e RT-PCR.....	105
4.6.4	PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR).....	107
4.7	Comparação da produção de biomassa entre as linhagens transgênica e selvagem.....	108
4.8	Quantificação e qualificação de ácidos graxos pela técnica de CG-EM.....	109
4.9	Quantificação das proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais e clorofila a.....	112
5.	DISCUSSÃO.....	113
6.	CONCLUSÕES.....	122
7.	REFERÊNCIAS.....	124
8.	SÚMULA CURRICULAR.....	136

1. INTRODUÇÃO:

1.1 Combustíveis derivados do Petróleo: cenário mundial, problemas e alternativas

Desde a revolução industrial, em meados do século XVIII, a produção e o uso de energia mudaram drasticamente o modo de produção e consumo no mundo. A energia é um fator de extrema importância para o desenvolvimento das nações, por isso existe uma correlação positiva entre o consumo de energia per capita dos países com seu índice de desenvolvimento humano (UNDP, 2007).

Nesta época, o grande motor dessa revolução foi o carvão mineral, somente sendo superado pelo petróleo depois de meados do século XX. Nos dias de hoje, a matriz energética tem sua base no consumo crescente de combustíveis fósseis, mantendo o carvão mineral como um dos protagonistas, assim como o gás natural e, principalmente, o petróleo. Podemos observar na Figura 1 a participação da oferta mundial de energia primária, essas três fontes (petróleo, gás natural e carvão mineral) representam juntas 81,1% do total (EPE, 2013).

Figura 1: Oferta mundial de energia por fonte (EPE, 2013).

Apesar de terem sido responsáveis por grandes mudanças positivas e avanços sem precedentes, trazendo conforto e comodidade para a humanidade, os combustíveis fósseis também trouxeram muitos problemas, e os efeitos colaterais de seu uso e exploração são alvo de preocupações e desafios futuros.

No âmbito econômico e político, não se pode deixar de frisar a fragilidade de um sistema baseado em derivados fósseis, que fornecem mais de 80% da energia utilizada em todo o mundo. No entanto, essas reservas são limitadas a algumas regiões (Boudghene Stambouli e Traversa, 2002), resultando em crises econômicas e conflitos políticos frequentes por mais de meio século (Figura 2).

Figura 2: Oscilação do preço do petróleo (óleo bruto), por interferência de questões políticas dos países com maior influência e com as reservas mais expressivas (Adaptado de <http://www.wtrg.com/prices.htm>, acesso em 31/03/14).

No que diz respeito ao meio ambiente, há um grande destaque no quesito das mudanças climáticas, que estão sendo vistas como um desafio para a humanidade neste século. Neste contexto, a grande preocupação é o aquecimento global (ou “efeito estufa”), fenômeno gerado pela emissão de gases causadores do efeito estufa (GEEs), sendo eles o dióxido de carbono (CO_2), o metano (CH_4), o óxido nitroso (N_2O), Perfluorcarbonetos (PFCs) e também o vapor de água. Dentre estes gases o dióxido de carbono (CO_2) é emitido em quantidade excessiva em relação aos outros e, além disso, possui um tempo de permanência maior na atmosfera, sendo considerado mais prejudicial (Rocha, 2009). Estima-se que em 1850 (início da Revolução Industrial) a concentração atmosférica de CO_2 era de 270 partes por milhão (ppm), já em 2000 essa quantidade era de aproximadamente 360 ppm (Raven *et al.*, 2001). Essa concentração vem crescendo de maneira preocupante, ultrapassando a marca de 400 ppm no final de 2013. A liberação excessiva de GEEs

está relacionada, principalmente, ao modelo energético global, onde a principal matriz tem como fontes de matéria-prima recursos naturais não renováveis, em especial o petróleo (Mattei, 2008).

Diante dessa preocupação, esforços vêm sendo traçados para a criação de metas com a intenção de redução da emissão dos GEEs. O protocolo de Kyoto, por exemplo, assinado em 1997, propõe para 2020 uma taxa de 20% do consumo global de energia ser proveniente de fontes renováveis. No entanto, essa medida se mostrou ineficiente para a resolução do problema, uma vez que países com altas taxas de emissão de CO₂, como os Estados Unidos da América (EUA), se negam sequencialmente a assinar esse tipo de tratado (Leite e Leal, 2007).

A maioria das emissões está diretamente associada com a expansão dos setores de energia e transporte, que dependem de um aumento da demanda global por petróleo e gás natural de baixo custo. No entanto, as avaliações internacionais de recursos energéticos afirmam que os combustíveis fósseis de baixo custo, que estão sustentando a expansão internacional do comércio, podem tornar-se limitados em curto prazo (IEA, 2008a). Grande parte da discussão a respeito de disponibilidade limitada de petróleo gira em torno do conceito de " pico do petróleo " (Figura 3), ou seja, o ponto em que a produção global de petróleo convencional atingirá um pico e começará a declinar, como já ocorreu em alguns países, como os EUA, que atingiu seu pico do petróleo nacional em torno de 1970 (Hubbert, 1956). O pico do petróleo global vai resultar em problemas econômicos, sociais e ambientais ainda mais graves associados com o aumento do preço do petróleo e do aumento na demanda por alternativas para preencher uma futura lacuna crescente entre a demanda e a oferta de petróleo convencional (IEA, 2008a).

Figura 3: Adaptação do diagrama original de Hubbert (1956) mostrando a previsão do pico do petróleo.

Ainda no contexto ambiental, há o constante risco de acidentes envolvendo o transporte de petróleo, principal combustível fóssil utilizado atualmente. O transporte ocorre, principalmente, por meio de navios superpetroleiros pelos oceanos, o que resulta em vazamentos regulares do produto em todo o mundo. Grandes derramamentos normalmente são bem divulgados pela imprensa, porém, vazamentos menores ocorrem com uma maior frequência e, na maioria das vezes, não são documentados. Estes vazamentos, apesar de serem de pequena proporção, quando considerados em conjunto, são significativamente ameaçadores aos ecossistemas marinhos e a outros ecossistemas relacionados (Gieg e Suflita, 2005; Phil e Atlas, 2005).

Também devemos considerar os impactos diretos causados pela procura e pela exploração dos poços de petróleo em si. Desmatamento, destruição de ecossistemas, contaminação química de solos e água, danos à população local de fauna e flora, riscos à saúde dos trabalhadores e deslocamento de comunidades

locais são exemplos claros desses impactos. Os efeitos ambientais dessa invasão de habitat e os efeitos crônicos da perfuração dos poços e da geração de resíduos sólidos, além do descarte da água contaminada na população bentônica, nas populações de pássaros migratórios e de mamíferos marinhos constituem sérias preocupações para esses ecossistemas (Epstein e Selber, 2002).

É neste panorama, cheio de conflitos políticos, problemas sociais, crises econômicas e impactos ambientais causados pela utilização, exploração e comercialização dos combustíveis fósseis que ganha importância a discussão na procura de alternativas à atual matriz energética mundial. Neste momento, os biocombustíveis entram como uma das opções mais viáveis tanto para os países desenvolvidos quanto para os países em desenvolvimento. O termo biocombustível nos dá a idéia do uso de produtos energéticos limpos e sustentáveis, podendo significar a mudança de um modelo baseado em combustíveis fósseis para um modelo com base no uso de produtos e biomassa de origem animal e vegetal renováveis e sustentáveis.

1.2 Biocombustíveis: definição, tipos, panoramas mundial e nacional

Os biocombustíveis constituem recursos não tóxicos, biodegradáveis e renováveis, e estão associados à vantagens ambientais, já que permitem a redução de emissões de poluentes, principalmente os gases de efeito estufa, o que os torna uma alternativa energética cada vez mais explorada. Isso ocorre, pois, através da fotossíntese, o CO₂ emitido pela queima de biomassa é fixado novamente (McKendry, 2002). Além disso, a queima desse tipo de combustível libera menos enxofre na atmosfera do que os combustíveis fósseis, sendo considerados menos poluentes (Putum, 2002).

A Agência Internacional de Energia (IEA, 2004) classifica os biocombustíveis segundo sua origem, processos de obtenção e complexidade industrial. Já a FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2013) divide as matérias-primas para biocombustíveis em quatro grandes categorias: (1) matérias-primas de alta eficiência (por exemplo, óleo de palma, cana-de-açúcar); (2) matérias-primas de eficiência moderada (por exemplo, milho, soja, canola, açúcar de beterraba); (3) matérias-primas em desenvolvimento (por exemplo, sorgo sacarino, pinhão manso) e (4) matérias-primas destinadas exclusivamente à geração de energia (por exemplo, gramíneas, miscantus, culturas de rotação curta, algas, resíduos).

1.2.1 A história dos biocombustíveis:

A utilização de biocombustíveis não é uma descoberta recente. A transesterificação de óleos vegetais tem sido amplamente conhecida e utilizada desde o século 19. Na realidade, o processo utilizado hoje ainda é o mesmo utilizado no passado. As matérias-primas também são muito semelhantes. O amendoim, o cânhamo, o óleo de milho e o sebo de animais foram parcialmente substituídos por soja, colza, resíduos florestais, cana-de-açúcar, algas, entre outros. No entanto, a história dos biocombustíveis é mais política e econômica do que tecnológica (Luque *et al.*, 2008).

Os biocombustíveis utilizados no setor de transportes são empregados desde os primórdios da indústria automobilística. O inventor do motor de combustão interna, o alemão Nikolaus August Otto (Figura 4A), concebeu sua invenção para funcionar a etanol. Já em 1898, Rudolph Diesel (Figura 4B) usou óleo de amendoim (o biodiesel “original”) quando fez a primeira demonstração de seu motor de ignição por compressão na Exposição Mundial em Paris. Isto ocorreu por solicitação e

investimento do Governo Francês, pois o amendoim era produzido em grandes quantidades nas colônias francesas, o que tornaria o país independente da importação de combustíveis líquidos (Knothe, 2006). Os óleos vegetais foram utilizados em motores diesel até 1920, quando uma alteração foi feita ao motor permitindo assim que o mesmo funcionasse com um resíduo do petróleo, atualmente conhecido como diesel (Luque *et al.*, 2008).

Poucos possuem conhecimento sobre isso, mas, além de Diesel, outros grandes inventores também acreditavam que os biocombustíveis poderiam ser o caminho para o setor de transportes. Henry Ford (Figura 4C) estava convencido de que os recursos renováveis eram a chave para o sucesso de seus automóveis, tanto que, a partir do modelo T 1908, eles foram projetados para rodar à etanol. Ford também construiu uma usina de etanol no Centro-Oeste dos EUA e estabeleceu uma parceria com a companhia norte-americana *Standard Oil Co. Inc.* para comercializá-lo em suas estações de distribuição (Luque *et al.*, 2008).

Figura 4: (A) Nikolaus August Otto; (B) Rudolph Diesel e (C) Henry Ford.

O interesse na utilização de biocombustíveis à base de óleo vegetal somente ressurgiu durante o período da segunda guerra mundial e pós-guerra, quando houve a escassez de petróleo devido a problemas na sua distribuição e falta de recursos (Delalibera, 2009). Neste momento, tanto os países Aliados quanto a Alemanha utilizaram combustíveis de biomassa em suas máquinas. A Alemanha experimentou a escassez extrema de petróleo durante o período da guerra, alimentando seus veículos com misturas que incluíam, por exemplo, o *Reichskraftsprit*, uma mistura de gasolina com álcool fermentado a partir de batatas. Na Grã-Bretanha, álcool de cereais foi misturado com gasolina pela *Distillers Company Ltd.* sob o nome *Discol* e comercializado. No entanto, até que fosse extremamente necessário novamente, os biocombustíveis permaneceram na obscuridade. Essa necessidade surgiu com a primeira grande crise mundial do petróleo. Até os anos 70, a indústria baseada na gasolina estava fortemente consolidada, fazendo todos os países (produtores ou não) altamente dependentes do fornecimento desse petróleo. Em 1973 a oferta de petróleo bruto ficou limitada, fazendo a Organização dos Países Produtores de Petróleo (OPEP), controladora da maior parte das reservas de petróleo globais, aumentar os preços do óleo. O barril teve um aumento de 387% em 1974 em relação ao ano anterior. (Luque *et al.*, 2008; <http://www.history.com/this-day-in-history/opec-states-declare-oil-embargo>, acesso em 20/04/2014). Em 1978 houve uma segunda crise, assim como a primeira, desencadeada por problemas políticos e econômicos e expondo a grande dependência do resto do mundo dos países exportadores de petróleo e evidenciando a necessidade de uma alternativa a essa dependência.

A partir de então, o potencial dos biocombustíveis vieram à tona novamente, trazendo de volta diversos programas de bioenergia, incluindo o Programa Nacional

do Álcool (Proálcool), estabelecido no Brasil em 1975, e a criação de organizações internacionais voltadas para bioenergia, como a Agência Internacional de Energia (AIE), criada em 1978 com o intuito de gerar cooperação e comunicação entre os países que possuem programas nacionais de pesquisa, desenvolvimento e implementação de bioenergia (Luque *et al.*, 2008).

1.2.2 Biocombustíveis no cenário mundial e nacional

Os líderes mundiais em desenvolvimento e utilização de biocombustíveis atualmente são: Brasil, Estados Unidos (EUA), Alemanha, França e Suécia. É comum, em países onde a indústria de biocombustíveis é bem estabelecida, que as primeiras e principais matérias primas a serem utilizadas sejam as culturas economicamente mais importantes para o país (por exemplo, o milho nos EUA, a colza na União Européia e a cana-de-açúcar no Brasil) (FAO, 2013).

No caso específico do Brasil, o álcool começa a ser utilizado no período da Primeira Guerra Mundial (1914/1918), fato obviamente acompanhado por problemas na distribuição do petróleo para os importadores. Porém foi no ano de 1929, quando ocorreu a crise conhecida como “A Grande Depressão”, que o Brasil, assim como outros países, sentiu a necessidade de se fazer menos dependente de outros países, principalmente dos EUA. Foi quando, em 1931, o Governo Federal Brasileiro criou o decreto de Número 19.717, que empregava a obrigatoriedade da adição de 5% de etanol à gasolina, dessa forma diminuindo a quantidade de combustíveis fósseis utilizada e, ao mesmo tempo, amparando a lavoura canavieira que possuía excedentes de álcool (Mota *et al.*, 2009).

A partir de então a matriz energética nacional não teve grandes alterações devido ao preço do petróleo estável e à grande oferta mundial de combustíveis

fósseis. No entanto, foi após a primeira grande crise do petróleo mundial, em 1973, que isso mudou. Em 1974, com a assinatura do decreto Número 76.595, foi criado o ProÁlcool, que teve como objetivo substituir a gasolina por álcool etílico. Isso gerou 10 milhões de automóveis à gasolina a menos no país, diminuindo significativamente nossa dependência pelo petróleo importado. Duas figuras importantes na idealização desse programa são o físico José Walter B. Vidal (Figura 5A) e o “pai do motor a álcool” Urbano Ernesto Stumpf (Figura 5B) (Mota *et al.*, 2009).

Figura 5: (A) José Walter B. Vidal e (B) Urbano Ernesto Stumpf.

Desde então a participação dos biocombustíveis no nosso cenário energético só aumentou, alcançando seu ápice em 1983, pouco após a segunda grande crise do petróleo. Naquele momento, 90% dos automóveis vendidos rodavam a álcool evidenciando uma certa independência pelo menos no que se trata de combustíveis para o setor de transporte. Com a queda no preço do petróleo em 1989 e a equiparação do preço da gasolina e do etanol, a utilização do álcool cai bastante, porém é implementada a obrigatoriedade da adição de 20 a 25% de etanol à gasolina comercializada

(<http://www.anp.gov.br/?pg=60467&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1400164596326>, acesso em 20/04/2014).

Em adição a isso, a pesquisa e a implementação de novos biocombustíveis à nossa matriz energética continuava em alta e, em 2005, foi lançado o Programa Nacional de Biodiesel modificando mais uma vez a matriz energética brasileira para combustíveis veiculares (Figura 6). Com o sucesso da obrigatoriedade do B2 (adição de 2% de biodiesel ao diesel), o governo implementou o B4 (adição de 4%), o que trouxe benefícios no quesito meio ambiente, pois a cada litro da mistura B4 a emissão de CO₂ é diminuída em 3% (<http://www.anp.gov.br/?pg=60467&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1400164596326>, acesso em 20/04/2014). Além disso, também houve uma considerável diminuição na importação de óleo diesel, uma importante vantagem levando-se em consideração que o Brasil não é um país autosuficiente na produção de diesel. Em 2009, por exemplo, US\$ 900 milhões de dólares foram economizados. Em menos de 5 anos do programa, ou seja, no início de 2010, já era obrigatória a mistura de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo, implementação esta que foi antecipada pelo sucesso do programa, pois estava prevista apenas para 2013, trazendo uma economia de mais de US\$ 1 bilhão de dólares/ano ao Brasil.

Figura 6: Matriz energética brasileira para combustíveis veiculares. (A) divisão da matriz energética antes da implementação do programa de biodiesel e (B) no segundo semestre de 2008, depois da implementação do mesmo. (Fonte: MDA)

Um resumo dos eventos mais importantes do histórico dos biocombustíveis no Brasil pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7: Evolução dos biocombustíveis no Brasil. Fonte: ANP (<http://www.anp.gov.br/?pg=60467&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1400209948850>, acesso em 01/04/14).

Quando comparado ao diesel de petróleo, o biodiesel possui significativas vantagens. Estudos do *National Biodiesel Board* (associação que representa a

indústria de biodiesel nos Estados Unidos) demonstraram que a queima de biodiesel pode emitir em média 48% menos monóxido de carbono (CO); 47% menos material particulado (que penetra nos pulmões) e 67% menos hidrocarbonetos. Além do fato do próprio processo de produção já ser mais limpo por si só (<http://www.anp.gov.br/?pg=60467&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1400209948850>, acesso em 01/04/14) e ser proveniente das mais diversas fontes, como por exemplo algodão, sebo bovino, soja, dendê, girassol, babaçu, amendoim, mamona, pinhão-manso, entre outras.

Além disso, o programa objetiva também a geração de emprego, o desenvolvimento regional e a inclusão social. Por exemplo, a criação do Selo Combustível Social, que é um componente de identificação concedido pelo Ministério do Desenvolvimento Agrário às empresas produtoras de biodiesel que promovem o desenvolvimento regional e a inclusão social gerando emprego e renda para pequenos agricultores familiares que estão enquadrados na Pronaf.

Como vantagem, o produtor de biodiesel tem algumas condições especiais:

- Diferenciação/isenção nos tributos PIS/PASEP e COFINS;
- Participação assegurada de 80% do biodiesel negociado nos leilões públicos da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP);
- Acesso às melhores condições de financiamento junto aos bancos que operam o Programa (ou outras instituições financeiras que possuam condições especiais de financiamento para projetos);
- Possibilidade de uso do Selo Combustível Social para promover sua imagem no mercado.

Como contrapartida à estes benefícios o produtor assume algumas obrigações, são elas:

- Aquisição de um percentual mínimo de matéria prima dos agricultores familiares no ano de produção de biodiesel;
- Celebrar previamente contratos de compra e venda de matérias primas com os agricultores familiares ou com suas cooperativas e com anuência de entidade representativa da agricultura familiar daquele município e/ou estado;
- Assegurar capacitação e assistência técnica à esses agricultores familiares contratados; entre outras.

A comercialização desse biodiesel produzido ocorre por meio de leilões organizados pela ANP e pela Petrobras. Após calculado o volume de biodiesel que será necessário para uma demanda de três meses, é realizado um primeiro leilão onde 80% do volume é comercializado e só participam deste leilão as empresas que possuem o Selo Combustível Social. O restante é leilado por qualquer empresa que possua autorização da ANP (Rodrigues, 2008). As empresas que possuem, hoje, o Selo Combustível Social estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Empresas que possuem o Selo Combustível. (Fonte: <http://portal.mda.gov.br/portal/saf/programas/biodiesel/2286313>, acesso em 01/04/14).

Relação das Empresas com Selo Combustível Social						
Nº.	Empresa	Município	UF	CNPJ	Concessão	Renovação
1	GRANOL Indústria, Comércio e Exportação S.A.	Anápolis	GO	50.290.329/0026-60	14/11/06	28/12/11
2	FERTIBOM Indústrias Ltda.	Catanduva	SP	00.191.202/0001-68	24/11/06	28/12/11
3	BARRALCOOL - Usina Barralcoool S.A	Barra dos Bugres	MT	33.664.228/0001-35	26/03/07	24/12/12
4	OLEOPLAN S.A. – Óleos Vegetais Planalto	Veranópolis	RS	88.676.127/0002-57	04/05/07	24/12/12
5	CARAMURU Alimentos S.A	São Simão	GO	00.080.671/0003-71	03/07/07	24/12/12
6	GRANOL Indústria, Comércio e Exportação S.A.	Porto Nacional	TO	50.290.329/0084-30	19/07/07	24/12/12
7	BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A	Passo Fundo	RS	07.322.382/0001-19	01/08/07	24/12/12
8	FIAGRIL Ltda.	Lucas do Rio Verde	MT	02.734.023/0008-21	30/10/07	24/12/12
9	GRANOL Indústria, Comércio e Exportação S.A.	Cachoeira do Sul	RS	50.290.329/0061-43	12/11/07	24/12/12
10	JBS S.A.	Lins	SP	02.916.265/0133-00	12/11/07	24/12/12
11	PETROBRAS Biocombustível S.A.	Candeias	BA	10.144.628/0003-86	12/08/08	30/12/13
12	ARAGUASSU Óleos Vegetais Indústria e Comércio Ltda.	Porto Alegre do Norte	MT	04.111.111/0001-26	15/10/08	30/12/13
13	PETROBRAS Biocombustível S.A.	Quixadá	CE	10.144.628/0002-03	15/10/08	30/12/13
14	BIOCAMP Indústria e Comércio Importação e Exportação de Biodiesel Ltda.	Campo Verde	MT	08.094.915/0001-15	13/02/08	30/12/13
15	PETROBRAS Biocombustível S.A.	Montes Claros	MG	10.144.628/0004-67	25/02/09	
16	BIOPAR Produção de Biodiesel Parecis Ltda.	Nova Marilândia	MT	08.684.263/0001-79	28/05/09	
17	BIOPAR - Bioenergia do Paraná Ltda.	Rolândia	PR	07.922.068/0001-77	16/11/09	
18	Transportadora CAIBIENSE Ltda.	Rondonópolis	MT	75.817.163/0007-56	08/02/10	
19	BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A	Marialva	PR	07.322.382/0004-61	20/05/10	
20	OLFAR Indústria e Comércio de Óleos Vegetais Ltda.	Erechim	RS	91.830.836/0006-83	20/05/10	
21	BIOTINS – Companhia Produtora de Biodiesel do Tocantins	Paraíso do Tocantins	TO	07.913.930/0001-85	21/05/10	
22	CARAMURU Alimentos S.A	Ipameri	GO	00.080.671/0021-53	12/11/10	
23	COOPERBIO – Cooperativa de Biocombustível	Cuiabá	MT	08.306.244/0001-09	16/11/10	
24	GRUPAL Agroindustrial S.A	Sorriso	MT	08.045.552/0002-09	16/11/10	
25	CAMERA Agroalimentos S.A	Ijuí	RS	98.248.644/0026-56	15/02/11	
26	DELTA Biocombustíveis, Indústria e Comércio LTDA.	Rio Brilhante	MS	11.513.699/0001-00	15/02/11	
27	V-BIODIESEL Ltda.	Iraquara	BA	13.463.913/0003-58	12/04/11	
28	BIO ÓLEO Indústria e Comércio de Biocombustível LTDA.	Cuiabá	MT	08.387.930/0001-51	16/05/11	
29	COOPERFELIZ – Cooperativa Agroindustrial dos Produtores Rurais de Feliz Natal	Feliz Natal	MT	08.382.761/0001-67	16/05/11	
30	BIOCAMP Indústria e Comércio de Óleos Vegetais e Biodiesel LTDA.	Dourados	MS	07.779.869/0001-25	18/11/11	
31	CESBRA Química S.A.	Volta Redonda	RJ	08.436.584/0001-54	18/11/11	
32	SPBIO Indústria e Comércio de Biodiesel e Óleos Vegetais LTDA.	Sumaré	SP	05.164.528/0001-10	18/11/11	
33	MINERVA S.A.	Palmeiras de Goiás	GO	67.620.377/0047-05	24/02/12	
34	BREJEIRO Produtos Alimentícios Orlândia S/A Comércio e Indústria	Orlândia	SP	53.309.845/0001-20	24/02/12	
35	ADM do Brasil Ltda.	Rondonópolis	MT	02.003.402/0024-61	24/02/12	
36	BIONASA Combustível Natural S.A.	Porangatu	GO	06.123.299/0001-58	23/05/12	
37	BINATURAL Indústria e Comercio de Óleos Vegetais LTDA.	Formosa	GO	07.113.559/0001-77	23/05/12	
38	BIANCHINI S.A., Indústria, Comércio e Agricultura.	Canoas	RS	87.548.020/0002-60	13/11/12	
39	CARGILL Agrícola S.A.	Três Lagoas	MS	60.498.706/0294-81	13/11/12	
40	BUNGE Alimentos S/A.	Nova Mutum	MT	84.046.101/0543-66	23/01/13	
41	POTENCIAL Biodiesel LTDA.	Lapa	PR	12.613.484/0001-23	20/03/13	
42	ADM do Brasil LTDA.	Joaçaba	SC	02.003.402/0046-77	10/05/13	
43	FUGA COUROS S.A.	Camargo	RS	91.302.349/0016-10	10/05/13	
44	BOCCHI Indústria, Comércio, Transporte e Beneficiamento de Cereais LTDA.	Muitos Capões	RS	02.987.873/0010-56	12/09/13	
45	NOBLE Brasil S.A.	Rondonópolis	MT	06.315.338/0026-77	22/11/13	
46	TRÊS TENTOS Agroindustrial S.A.	Ijuí	RS	94.813.102/0017-37	24/03/14	

Para conseguir ser um produtor existem regras e especificações em que o biocombustível precisa se encaixar para que seja possível misturá-lo ao diesel sem perda de qualidade e propriedades delimitadas pela ANP. A determinação das características do biodiesel deve ser realizada de acordo com as normas da

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais da *American Society for Testing and Materials (ASTM)*, da *International Organization for Standardization (ISO)* e do *Comité Européen de Normalisation (CEN)*. As características da Tabela 2 devem ser determinadas e se enquadrar dentro de um padrão para que, então, o biodiesel possa ser comercializado.

Tabela 2: Especificações do biodiesel a ser comercializado (Modificado de RESOLUÇÃO ANP Nº 14, DE 11.5.2012 - DOU 18.5.2012).

Característica	Unidade	Limite
Aspecto	-----	-----
Massa específica a 20 ^o C	Kg/m ³	850 a 900
Viscosidade Cinemática a 40 ^o C	mm ² /s	3,0 a 6,0
Teor de água, max.	mg/kg	-----
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24
Ponto de fulgor, mín.	^o C	100,00
Teor de éster, mín.	% massa	96,5
Resíduo de carbono, máx.	% massa	0,050
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020
Enxofre total, máx.	mg/kg	10
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5
Fósforo, máx.	mg/kg	10
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-----	1
Número Cetano	-----	Anotar
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	^o C	-----
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02
Glicerol total, máx.	% massa	0,25
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,80
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20
Índice de lodo	g/100g	Anotar
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	h	6

Para chegar a tais especificações e se tornar compatível com os motores movidos a diesel, o óleo vegetal precisa passar por um processo químico para converter o óleo bruto a moléculas que possam ser utilizadas na combustão do

motor do ciclo diesel. Antes de falarmos sobre os processos químicos utilizados para fazer a conversão desse óleo a moléculas menores, é interessante entender um pouco mais sobre a composição química dessas moléculas e sua síntese.

1.2.3 Biodiesel: estrutura e biossíntese de triacilgliceróis (TAG)

Os óleos e gorduras vegetais são encontrados predominantemente na forma Triacilgliceróis (TAG) são uma forma de armazenamento de energia muito eficiente, pois se tratam de moléculas extremamente apolares e insolúveis, podendo ser compartimentalizadas, e só mobilizadas quando necessário. O esqueleto dessas moléculas é formado por triésteres de glicerol com ácidos graxos (Figura 8A). Estes ácidos graxos, por sua vez podem variar em identidade e posição em relação à molécula de glicerol (Figura 8B), dando as características químicas e físicas de acordo com essa composição. Óleos de origem vegetal, por exemplo, geralmente são mais ricos em resíduos de ácidos graxos insaturados do que as gorduras animais, o que implica no menor ponto de fusão dos óleos.

Figura 8: (A) Fórmula geral de um triacilglicerol, em preto a molécula de glicerol e em vermelho a ligação éster e o R representando cada cadeia de ácido graxo; (B) Duas moléculas diferentes de TAG por apresentarem ácidos graxos diferentes ligados ao esqueleto de glicerol.

A síntese de lipídios é feita, principalmente, a partir de glicose, a qual é substrato para a glicólise, formando piruvato e posteriormente acetil-CoA. Depois é utilizada a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) que catalisa um passo importante na via sintética de ácidos graxos, envolvendo biotina e ATP, e realizando a carboxilação do acetil-CoA para formar malonil-CoA (Davis, *et al.*, 2000; Kim, 1997; Li e Cronan, 1993; Sendl *et al.*, 1992).

Uma vez que malonil-CoA é sintetizado, este é transferido pela malonil-CoA transacetilase para a proteína transportadora de acil (ACP). Cada uma das passagens pelo ciclo aumenta dois átomos de carbono proveniente de um acetil-CoA que é incorporado, o átomo de carbono que sobra é liberado em forma de uma molécula de CO₂. Esta reação utiliza o NADPH como agente redutor e ocorre no complexo multienzimático da síntese de ácido graxo (FAS). O FAS é um complexo de várias enzimas individuais que catalisam a formação de um ácido graxo com cadeia de até 16 ou 18 carbonos. ACC não é considerada uma enzima do complexo FAS, entretanto, a proteína transportadora de acil, um cofator essencial, é geralmente considerado um componente do complexo FAS (Subrahmanyam & Cronan, 1998).

Existem dois tipos de FAS. Plantas e bactérias possuem FAS do tipo II (Rock e Jackowski, 2002), em que cada enzima atua individualmente, ou seja, pode catalisar uma reação enzimática. Ao contrário de animais e fungos que possuem FAS do tipo I, um único complexo multienzimático, caracterizado por grandes subunidades (250 KDa), é capaz de catalisar várias reações diferentes (Verwoert *et al.*, 1995). A FAS catalisam a elongação do ácido graxo pela condensação de moléculas de malonil-CoA e acetil-CoA. ACP uma das subunidades de FAS contém um grupo tiol que pode formar malonil-ACP via formação de ligações tioésteres com

malonil-CoA, seguindo com o crescimento em ordem da cadeia acil assegurando seu transporte (Subrahmanyam & Cronan, 1998). ACP pode fixar acetil para a formação de acetil-ACP que são transferidos para outra subunidade de FAS, seguindo a cetoacil-ACP sintase (KAS), que catalisa a condensação de malonil-ACP ou o crescimento da cadeia acil, forma cetobutiril-ACP ou cetoacetil-ACP. A síntese do ácido graxo com 16 carbonos (C16) requer que o ciclo seja repetido sete vezes. Durante o primeiro ciclo, a reação de condensação é catalisada pela cetoacil-ACP sintase (KAS III) e o restante dos seis ciclos a reação de condensação é catalisada pela isoforma I de KAS (KAS I) que é utilizada durante a conversão de 16:0 (ácido palmítico) para 18:0 (ácido esteárico). Por último ACP-tioesterase cliva a cadeia acil e libera o ácido graxo formado (Subrahmanyam & Cronan, 1998) (Figura 9).

Figura 9: Biossíntese global de TAG, onde: ME-enzima málica, FAS-complexo de enzimas que catalisam a conversão de acetil-CoA a malonil-CoA, GPAT-acil-CoA glicerol-sn-3-fosfato acil-transferase, LPAT-lisofosfatidil acil-transferase, DGAT-acil-CoA diacylglicerol acil-transferase, ACL-ATP citrato liase, ACS-Acetil-CoA sintetase (modificado de Courchesne *et al.*, 2009).

Para se obter cadeias mais longas ou cadeias insaturadas, são necessárias enzimas como elongases e desaturases que agem no palmitato e estearato. Estas enzimas estão localizadas na membrana do retículo endoplasmático e mitocôndria.

Em eucariotos, a formação de TAG se inicia em organelas especializadas, mitocôndrias e cloroplastos (em plantas), e finaliza no retículo endoplasmático. Já em procariotos a síntese é realizada no citoplasma da célula, o que é uma desvantagem, pois os TAG não são estocados, ocupando um espaço que poderia estar livre na célula (Rajakumari *et al.*, 2008).

O passo número um da síntese de TAG é a condensação de glicerol-3-fosfato (G3P) com acil-CoA para formar lisofosfatidato (LPA), que é catalisado pela acil-CoA glicerol-sn-3-fosfato acil-transferase (GPAT). Esta enzima exibe uma baixa atividade específica na síntese de TAG quando comparada com outras enzimas da via de TAG, podendo assim, ser um fator limitante (Cao *et al.*, 2006; Coleman e Lee, 2004). O LPA é então condensado e catalizado pela GPAT com outro acil-CoA para produzir fosfatidato (PA). No passo seguinte, o PA pode ser desfosforilado pela enzima fosfatase do ácido fosfatídico (PAP), produzindo diacilglicerol (Athenstaedt e Daum, 1999).

Na última etapa da síntese de TAG ocorre a catálise através da enzima acil-CoA diacilglicerol acil-transferase (DGAT), capaz de incorporar o terceiro acil-CoA dentro da molécula de diacilglicerol. Esta enzima também é conhecida como um importante regulador desta via (Oelkers *et al.*, 2002; Sandager *et al.*, 2002). As TAG podem então, ser estocados em corpos lipídicos (Murphy, 2001) (Figura 9). Com base nas informações acima, podemos introduzir maiores detalhes sobre os

processos que transformam essas misturas de TAG em moléculas capazes de serem utilizadas para a combustão do motor e produção de energia cinética.

1.2.4 Biodiesel: a transformação do óleo vegetal em combustível

As reações mais conhecidas para isso são o (A) craqueamento, a (B) esterificação e a (C) transesterificação. Porém a transesterificação tem se mostrado a melhor opção por ser um processo relativamente simples e é por esse motivo que a ANP vem utilizando esta técnica para a produção do biodiesel.

(A) Craqueamento Térmico (Pirólise): É a conversão de uma substância em outra por meio de aquecimento, pode ter a presença ou não de um catalisador, na ausência de ar ou oxigênio, a temperaturas superiores a 450 °C (Weisz *et al.*, 1979).

O produto final do processo é quimicamente muito similar ao diesel de petróleo. Na reação há a quebra das moléculas de triglicerídeos levando a formação de uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados, lineares ou cíclicos, como por exemplo alcanos, alcenos, ácidos carboxílicos e aldeídos, bem como CO, CO₂ e H₂O. Dependendo do grau de insaturação dos compostos obtidos a partir dos TAG, a composição e propriedades do produto final vão variar muito (Fukuda *et al.*, 2001). O mecanismo geral de decomposição térmica por pirólise está esquematizado na Figura 10.

As desvantagens desse processo é que, em primeiro lugar, os equipamentos necessários para todo o procedimento são muito caros. Além disso, o fato de se retirar o oxigênio remove qualquer benefício que seria proporcionado pelo combustível oxigenado, como queima mais limpa e maior eficiência do combustível (Haertel, 2009).

Figura 10: Esquema do craqueamento de óleo vegetal. Esquema modificado de Haertel, 2009.

(B) Esterificação de ácidos graxos: Reação entre os ácidos carboxílicos livres provenientes nos óleos vegetais com metanol ou etanol, formando ésteres metílicos ou etílicos, respectivamente, e água (Aranda *et al.*, 2009)

De maneira geral nas reações de esterificação é utilizado um catalisador, que grande parte das vezes é um ácido inorgânico, como o ácido sulfúrico. Como a reação é reversível, ou seja, o ácido catalisa tanto a reação direta (esterificação) como a inversa (hidrólise do éster), é necessário deslocar o equilíbrio em favor do produto desejado. Como neste caso, o interesse é a formação dos ésteres, o ideal é que se retire a água ou que se adicione álcool em excesso (Boocock *et al.*, 2003). Na Figura 11 observamos um esquema geral da reação de esterificação.

Figura 11: Esquema geral da reação de esterificação (modificado de Haertel, 2009).

A reação de esterificação utiliza matérias primas ricas em ácidos graxos livres, que podem estar presentes em resíduos de subprodutos de processamentos industriais, como os óleos brutos, óleos de cozinha descartados e ainda produtos de origem animal, como o sebo. Por essa razão pode ser utilizado como um processo alternativo, possibilitando o aproveitamento desse tipo de matéria-prima ou em complementação ao processo de transesterificação de forma a evitar o excesso de ácidos graxos livres no produto final, o que atrapalha a purificação do biodiesel (Vieira, 2011).

(C) Transesterificação de triglicerídeos: Reação onde os triglicerídeos reagem com três moléculas de álcool formando ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol como coproduto (Figura 12). A reação é reversível e seu rendimento depende da relação molar entre o óleo e o álcool, o tipo de álcool, temperatura e tempo de reação e tipo de catalisador (ácido ou base forte). (Vieira, 2011). Para que a reação ocorra, é necessária uma relação estequiométrica de, pelo menos, 3:1 de álcool em relação ao triglicerídeo, porém quanto mais excesso de álcool maior a produção de ésteres (Figura 13).

Figura 12: Esquema geral da reação de transesterificação (modificado de Haertel, 2009)

Figura 13: Esquema da transesterificação de óleo vegetal com a utilização de metanol. (modificado de Haertel, 2009)

A transesterificação pode também ter sua eficiência otimizada pela adição de catalisadores ácidos ou básicos, como o ácido sulfúrico e o hidróxido de sódio, respectivamente. Os catalisadores básicos são os mais utilizados (Pinto *et al.*, 2005).

Este processo é o mais economicamente viável e de maior eficiência entre os três apresentados, tendo em vista a composição dos principais óleos utilizados para a produção de biodiesel. Outro aspecto importante em termos de viabilidade econômica é o aproveitamento da glicerina formada no processo, que é separada

por decantação ou centrifugação e, posteriormente, purificada para ser usada em aplicações como alimentação animal, polímeros, surfactantes, lubrificantes, entre outros. Os ésteres metílicos produzidos também devem ser purificados antes de serem comercializados como biodiesel (Haertel, 2009).

1.2.5 Biodiesel: fontes de triacilgliceróis

O Brasil, por ser um país de grande biodiversidade, possui uma gama de oleaginosas com potencial para produção do óleo que será transformado em biodiesel, fato representado na tabela 3.

Tabela 3: Culturas oleaginosas com potencial para produção de óleo vegetal e biodiesel, e referência média de produtividade de óleo por hectare (Delalibera, 2009).

Matéria Prima	Rendimento (L.ha⁻¹)	Matéria Prima	Rendimento (L.ha⁻¹)
Milho	170 a 200	Castanha de caju	170 a 200
Caroço de algodão	280 a 340	Dendê	3.700 a 6.000
Soja	440 a 550	Café	450 a 500
Semente de abóbora	500 a 600	Semente de coentro	530 a 570
Mostarda	550 a 600	Gergelim	600 a 800
Arroz	700 a 900	Girassol	720 a 940
Mamona	740 a 1000	Cacau	800 a 1000
Amendoim	900 a 1.100	Azeitona	1.200 a 1.500
Carnaúba	1.300 a 1700	Noz pecã	1.430 a 1.520
Jajoba	1.640 a 2000	Pinhão manso	1.800 a 3.000
Macadâmia	1.920 a 2.240	Castanha-do-Pará	2.000 a 2.500
Abacate	2.200 a 2.800	Coco	2.100 a 2.900

Como pode ser observado nesta tabela, todas as culturas vegetais que podem ser utilizadas para nos fornecer o óleo necessário para a conversão a biodiesel nos dias de hoje, utilizam terras aráveis para serem produzidas. Além disso, grande parte delas são culturas importantes para a indústria alimentícia e para a economia brasileira. Esta competição é um ponto negativo e será melhor discutido e exemplificado no parágrafo a seguir.

Hoje, a soja representa em torno de 80% das fontes de biodiesel do país (Figura 14), produto este que, em 2003, respondia por uma receita cambial direta para o Brasil de mais de sete bilhões de dólares anuais (superior a 11% do total das receitas cambiais brasileiras) e cinco vezes esse valor, se considerados os benefícios que gera ao longo da sua extensa cadeia produtiva (<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>, acesso em 20/04/2014). Em outras palavras, o Brasil, que é pioneiro mundial no uso de biocombustíveis e se encontra em uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia, se encontra limitado economicamente na expansão do setor de biodiesel. Isso acontece, pois não podemos deixar de produzir soja para produzir mais biocombustível, e nossas terras aráveis e férteis não podem se voltar exclusivamente para esse fim, uma vez que nossa economia depende muito da produção agrícola.

Figura 14: Principais matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil (Janeiro/2010 a Março/2011) (Fonte: <http://www.anp.gov.br/?id=472>, acesso em 01/04/14).

Pela questão tratada nos últimos parágrafos, há um crescente interesse em explorar outras matérias-primas possíveis, em especial as que são voltadas exclusivamente para a geração de energia, ou seja, que não competem com as culturas alimentares como canola, soja, milho e cana-de-açúcar. Essas culturas exclusivamente energéticas, além de apresentarem outras vantagens, acabam não remetendo a uma insatisfação na demanda atual para os combustíveis de transporte, pois essas fontes não substituiriam grandes plantações destinadas à alimentação e o conseqüente aumento no preço dos alimentos e desflorestamento (Haertel, 2009).

Neste contexto podemos destacar a utilização de algas para a produção de biomassa para biocombustível. Além de não competirem com nenhuma das culturas alimentares e não necessitarem de terras aráveis e férteis, estes organismos possuem inúmeras vantagens e um papel importantíssimo no meio ambiente. Antes de entrar do quesito dos biocombustíveis de algas, é interessante fazer uma breve introdução geral sobre a importância destes organismos e algumas de suas aplicações.

1.3 Algas

As algas se enquadram dentro do grupo dos eucariotos e possuem uma considerável diversidade de organismos. Algas são componentes autotróficos muito importantes em diversos ambientes, onde desempenham papel relevante na reciclagem de nutrientes e nas transformações energéticas, sendo organismos de fundamental importância na ecologia e como produtores primários da cadeia trófica (Hanisak 1983). Além disso, esses organismos também possuem grande importância econômica em diversos campos da indústria, tais como indústria

alimentícia, farmacêutica, aquicultura e como fonte de produtos comerciais de alto valor como carotenóides, ficocolóides e de ácido graxo poliinsaturado (Cardozo *et al.*, 2006; Tseng, 2001; Apt e Behrens, 1999).

Alguns grupos de pesquisas prevêem inúmeras aplicações para as algas como, por exemplo, na remoção de CO₂ pela emissão dos gases de combustíveis e da queima de carvão mineral, no desenvolvimento das algas verdes como produtores biológicos de gás hidrogênio e no uso de diatomáceas para biomanufaturar estruturas tridimensionais para a indústria de nanotecnologia (Hildebrand, 2005; Melis, 2002).

1.3.1 Microalgas para biodiesel: Espécies, vantagens, engenharia bioquímica e engenharia genética

O uso de microalgas para a produção de biodiesel também é uma aplicação de grande interesse devido a sua alta taxa fotossintética, quando comparada às plantas terrestres, além da possibilidade de cultivo em tanques (Aresta *et al.*, 2005). Muitos estudos têm sido realizados com microalgas, devido a sua capacidade de acumular grande parte da biomassa como lipídeos. Muitas espécies de microalgas são ricas em óleos, variando sua porcentagem entre 20% e 50% do peso seco na grande maioria das vezes, mas podendo chegar a ultrapassar os 70% em algumas espécies, como mostrado na Tabela 4 (Shay, 1993). Isso, aliado ao fato de que o tempo de “colheita” é muito menor em relação ao de plantas terrestres, eleva o potencial de produção de biodiesel de algas de maneira incomparável (Tabela 5).

Tabela 4: Quantidade percentual de lipídeo de algumas espécies de microalga.

Microalga	Conteúdo oleaginoso (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Tabela 5: Produtividade de fontes importantes de biodiesel (Chisti, 2007).

Cultura	Produção de óleo (L.ha⁻¹)	Área cultivável necessária (M.ha)
Milho	172	1.540
Soja	446	594
Colza	1.190	223
Coco	2.689	99
Óleo de palma	5.950	45
Microalgas (30% óleo/peso seco)	58.700	4.5
Microalgas (70% óleo/peso seco)	136.900	2

Apesar de produtoras naturais muito eficientes, maneiras de se aperfeiçoar ainda mais a produção de óleo e outros produtos de microalgas é uma forma de aumentar a produtividade sem a necessidade de aumentar a biomassa. Além disso, algumas algas enfrentam problemas de cultivo, crescimento em tanques e reatores e algumas, apesar de excelente taxa de crescimento, não produzem grande

quantidade de TAG. Dessa forma, vários estudos estão sendo dirigidos com o objetivo de melhorar e aumentar a produção de lipídeos de várias espécies de microalgas (Li *et al.*, 2008b).

Existem duas formas eficientes de se provocar mudanças em um organismo de modo a regular e modificar seu metabolismo. A primeira delas é modificando condições externas, ou seja, o meio em que ela está. A esse aspecto, da manipulação dos fatores abióticos, damos o nome de (A) Engenharia Bioquímica. A outra maneira é modificar alguma coisa no metabolismo da célula em si, e isso pode ser feito através da manipulação genética de organismo. Neste caso chamaremos (B) Engenharia Genética. Como no presente trabalho, ambas as técnicas foram empregadas, é importante que falemos um pouco de cada uma, bem como citemos alguns exemplos.

(A) Engenharia Bioquímica: Existem diversas estratégias bioquímicas para o melhoramento da produção de lipídios em microalgas. Tanto as condições de cultivo, como temperatura, pH, salinidade, luz e quantidade de CO₂, como através do controle nutricional é possível melhorar o fluxo metabólico gerado pela fotossíntese e em consequência aumentar a biossíntese de lipídios. A deficiência de alguns nutrientes também permite o aumento da síntese, a escassez de nitrogênio e fósforo, por exemplo, é um fator favorável para aumentar o fluxo metabólico para a biossíntese de lipídios, mas por outro lado, há uma diminuição no crescimento celular (Courchesne *et al.*, 2009).

Em algumas espécies de microalgas foi observado aumento da produção de lipídeos pela limitação de nutrientes. No gênero *Chlorella*, Illman *et al.* (2000) verificou que *C. emersonii*, *C. minutíssima*, *C. vulgaris* e *C. pyrenoidosa* poderiam

respectivamente acumular lipídeos em 63%, 57%, 40% e 23% do peso seco quando em baixa concentração de nitrogênio. Em *Neochloris oleoabundans* foi visto um aumento de 35 a 54% no acúmulo de lipídeos totais de seu peso seco, sendo que 80% foram triacilgliceróis (TAG) (Kawata *et al.*, 1998; Tornabene *et al.*, 1983). Situação similar ocorre quando há limitação de fósforo. A desvantagem dessa estratégia é que o aumento na síntese e/ou acúmulo de lipídios está diretamente ligado a uma diminuição do crescimento celular. Dessa forma, a quantidade de lipídeos produzida está associada com a baixa produtividade de biomassa (Ratledge e Wynn, 2002), sendo necessária uma otimização da técnica ou a busca por novas alternativas.

Assim como nos exemplos de escassez de nutrientes, outros estudos indicaram que as microalgas também poderiam redirecionar sua energia para a síntese e acúmulo de lipídeos nas mais adversas condições. Por exemplo, Takagi *et al.* (2006), relatou que quantidades de TAG aumentavam em *Dunaliella*, sob altas condições de salinidade. No presente trabalho, o aspecto abordado será a manipulação da concentração de nitrogênio no meio. Com essa abordagem podemos ver o que ocorre com a quantidade de lipídios e a taxa de crescimento das microalgas sob tais condições de estresse.

(B) Engenharia Genética: A engenharia genética oferece um grande potencial de aplicação comercial em algas transgênicas. Devido a numerosas vantagens que as microalgas possuem, já foi previsto que estas são uma poderosa ferramenta para produção de moléculas recombinantes comerciais (Cadoret *et al.*, 2008).

Diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de aumentar o acúmulo e a produção de lipídios em diferentes espécies de plantas e microalgas para a produção de biocombustíveis. Alguns destes estudos utilizam como ferramenta principal a engenharia genética para superexpressar enzimas que estejam relacionadas com a formação de ácidos graxos e/ou TAG. Diversos trabalhos utilizando essa abordagem já demonstraram resultados positivos em diversos tipos de plantas e outros organismos (Tabela 6).

Tabela 6: Algumas modificações genéticas em diversas espécies que obtiveram resultados positivos quanto ao aumento de lipídeo (Courchesne *et al.*, 2009).

Gene (enzima)	Espécies doadoras	Espécies receptoras	Nota	Refs
accA, accB, accC, accD, (ACC), tesA (tioesterase I),	<i>E. coli</i> (BL21) (bactéria)	<i>E. coli</i> (BL21) (bactéria)	+6 x síntese de ácidos graxos	Davis <i>et al.</i> (2000)
Acc1 (ACC citosólica)	<i>Arabidopsis</i> (planta)	<i>Brassica napus</i> (planta)	+1-2x ACC plastídica + 6% acúmulo de ácidos graxos	Roessler <i>et al.</i> (1997)
Acc1 (ACC)	<i>Arabidopsis</i> (planta)	<i>Solanum tuberosum</i> (planta)	+5x acúmulo de TAG	Klaus <i>et al.</i> (2004)
Acc1 (ACC)	<i>Cyclotella cryptica</i> (alga)	<i>Cyclotella cryptica</i> (alga)	+2-3x atividade de ACC, sem mudança no conteúdo lipídico	Dunahay <i>et al.</i> (1995) e Dunahay <i>et al.</i> (1996)
Acc1 (ACC)	<i>E. coli</i> (bactéria)	<i>E. coli</i> (bactéria)	+2-3x atividade de ACC, sem mudança no conteúdo lipídico	Dunahay <i>et al.</i> (1995) e Dunahay <i>et al.</i> (1996)
fabF (KASII)	<i>E. coli</i> (bactéria)	<i>E. coli</i> (bactéria)	Efeito tóxico (excesso de CoA de 0.5-40% em malonil-CoA	Subrahmanyam e Cronan (1998)
fabH (KASIII)	<i>E. coli</i> (bactéria)	<i>Brassica napus</i> (planta)	Estresse, parada do crescimento celular	Verwoert <i>et al.</i> (1995)
KASIII	<i>Spinacia oleracea</i> (planta)	<i>Nicotiana tabacum</i> (planta)	Acúmulo de C16:0 no óleo	Dehesh <i>et al.</i> (2001)
KASIII	<i>Spinacia oleracea</i> (planta)	<i>Arabidopsis</i> (planta)	Acúmulo de C16:0 no óleo	Dehesh <i>et al.</i> (2001)
KASIII	<i>Spinacia oleracea</i> (planta)	<i>Brassica napus</i> (planta)	Acúmulo de C16:0 no óleo	Dehesh <i>et al.</i> (2001)
LPAT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura)	<i>Brassica napus</i> (planta)	+6x acúmulo de óleo	Zou <i>et al.</i> (1997)
Are1 e are2 (DGAT)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)	levedura	+3-9x acúmulo de TAG	Bouvier-Nave <i>et al.</i> (2000)
Are1 e are2 (DGAT)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)	<i>Nicotiana tabacum</i> (planta)	+7x acúmulo de TAG	Bouvier-Nave <i>et al.</i> (2000)
DGAT	<i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)	+10-70% acúmulo de óleo	Jako <i>et al.</i> (2001)
acs (ACS)	<i>E. coli</i> (MG1655) (bactéria)	<i>E. coli</i> (MG1655) (bactéria)	+9x atividade de ACS, maior assimilação de acetato	Lin <i>et al.</i> (2006)
malEMt e malEMc (ME)	<i>Mortierella alpina</i> e <i>Mucor circinelloides</i> (fungos)	<i>Mucor circinelloides</i> (fungo)	+2,5x acúmulo de lipídeo	Zhang <i>et al.</i> (2007)
ACL	Rato	Tabaco	+ 16% acúmulo de lipídeo	Rangasamy e Ratledge (2000)
Gene PEP antisense	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Brassica napus</i>	+ 6,4-18 % acúmulo de lipídeo	Chen <i>et al.</i> (1999)

O emprego dessas técnicas só se tornou possível com o grande avanço nas últimas décadas no ramo da biologia molecular, em especial nas técnicas de seqüenciamento em larga escala, e diversas algas tiveram seus genomas desvendados (Tabela 7). Além de outros vários projetos que ainda se encontram em andamento (Tabela 8). Também genomas de organelas foram e estão sendo depositadas em bancos de dados, uma vez que as mesmas são de extrema importância na codificação de genes ou vias inteiras essenciais para a sobrevivência dos organismos e acumulação de compostos de estocagem (Wakasugi *et al.*, 1997; Maul *et al.*, 2002; Robbens *et al.*, 2007, Oudot-Le Secq *et al.*, 2007; de Cambiaire *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2010). Ainda neste contexto, análises de transcriptoma também são de grande valia uma vez que elas mostram a diferença na expressão de genes específicos em diversas condições, o que é extremamente necessário quando pensamos sobre novos genes alvo para engenharia genética e para o entendimento do metabolismo em geral (Blaby *et al.*, 2013; Thamatrakoln *et al.*, 2011; Monnier *et al.*, 2010; Fujiwara *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2011).

Todos esses esforços representaram uma revolução no estudo das rotas bioquímicas centrais desses organismos e o início de uma nova era de manipulação genética com as mais diversas finalidades. Com isso, genomas inteiros foram seqüenciados e genes, antes desconhecidos, foram caracterizados, permitindo a seleção de novos alvos para modificação genética.

Tabela 7: Genomas de algas publicados.

Grupo	Espécies	Referências
Plants-Chlorophyta	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Merchant <i>et al.</i> , 2007
Plants-Chlorophyta	<i>Chlorella variabilis</i>	Blanc <i>et al.</i> , 2010
Plants-Chlorophyta	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	Blanc <i>et al.</i> , 2012
Plants-Chlorophyta	<i>Micromonas pusilla</i>	Worden <i>et al.</i> , 2009
Plants-Chlorophyta	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Palenik <i>et al.</i> , 2007
Plants-Chlorophyta	<i>Ostreococcus tauri</i>	Derelle <i>et al.</i> , 2006
Plants-Chlorophyta	<i>Volvox carteri</i>	Prochnik <i>et al.</i> , 2010
Protists-Bacillariophyta	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Bowler <i>et al.</i> , 2008
Protists-Bacillariophyta	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Armbrust <i>et al.</i> , 2004
Protists-Cercozoa	<i>Bigelowiella natans</i>	Curtis <i>et al.</i> , 2012
Protists-Choanozoa	<i>Monosiga brevicollis</i>	King <i>et al.</i> , 2008
Protists-Cryptophyta	<i>Guillardia theta</i>	Curtis <i>et al.</i> , 2012
Protists-Cryptophyta	<i>Hemiselmis andersenii</i>	Lane <i>et al.</i> , 2007
Protists-Glaucocystophyceae	<i>Cyanophora paradoxa</i>	Price <i>et al.</i> , 2012
Protists-Haptophyceae	<i>Emiliania underpins</i>	Read <i>et al.</i> , 2013
Protists-Rhodophyta	<i>Pyropia yezoensis</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2013
Protists-Phaeophyceae	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Cock <i>et al.</i> , 2010
Protists-Rhodophyta	<i>Chondrus crispus</i>	Collén <i>et al.</i> , 2013
Protists-Rhodophyta	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Matsuzaki <i>et al.</i> , 2004
Protists-Rhodophyta	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Schönknecht <i>et al.</i> , 2013
Protists-Rhodophyta	<i>Porphyridium purpureum</i>	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2013
Protists-Stramenopiles	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	Gobler <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Pagani *et al.*, 2012.

Tabela 8: Alguns projetos de sequenciamento em andamento.

Grupo	Espécies	Estatus
Opisthokonta	<i>Monosiga ovata</i>	Em Progresso
Pinguiphyceae	<i>Pinguicoccus pyrenoidosus</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Bathycoccus prasinus</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Botryococcus braunii</i>	Completo
Plants-Chlorophyta	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Dictyochloropsis reticulata</i>	Completo
Plants-Chlorophyta	<i>Dunaliella salina</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Monoraphidium neglectum</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Nephroselmis olivacea</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Ostreococcus sp.</i>	Completo
Plants-Chlorophyta	<i>Polytomella capuana</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Polytomella magna</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Prototheca wickerhamii</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Em Progresso
Plants-Chlorophyta	<i>Trebouxioephyceae sp.</i>	Em Progresso
Protists-Alveolata	<i>Oxyrrhis marina</i>	Completo
Protists-Alveolata	<i>Symbiodinium sp.</i>	Completo
Protists-Bacillariophyta	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	Em Progresso

Prostists-Bacillariophyta	<i>Fragilariopsis cylindrus</i>	Completo
Prostists-Bacillariophyta	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	Completo
Prostists-Bacillariophyta	<i>Seminavis robusta</i>	Completo
Prostists-Bacillariophyta	<i>Synedra acus</i>	Em Progresso
Prostists-Bacillariophyta	<i>Thalassiosira oceanica</i>	Em Progresso
Prostists-Bacillariophyta	<i>Thalassiosira rotula</i>	Completo
Prostists-Bolidophyceae	<i>Bolidomonas pacifica</i>	Em Progresso
Prostists-Cryptophyta	<i>Chroomonas mesostigmatica</i>	Em Progresso
Prostists-Cryptophyta	<i>Chrysophyceae sp.</i>	Completo
Prostists-Cryptophyta	<i>Goniomonas sp.</i>	Em Progresso
Protists-Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Rascunho
Protists-Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis granulata</i>	Em Progresso
Protists-Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis limnetica</i>	Em Progresso
Protists-Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Rascunho
Protists-Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Em Progresso
Protists-Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis salina</i>	Em Progresso
Protists-Eustigmatophyceae	<i>Nannochloris sp.</i>	Em Progresso
Prostists-Haptophyceae	<i>Emiliania huxleyi</i>	Em Progresso
Prostists-Haptophyceae	<i>Isochrysis galbana</i>	Em Progresso
Prostists-Haptophyceae	<i>Pavlova lutheri</i>	Em Progresso
Prostists-Haptophyceae	<i>Pavlova sp.</i>	Completo
Prostists-Haptophyceae	<i>Phaeocystis antarctica</i>	Completo
Prostists-Haptophyceae	<i>Phaeocystis globosa</i>	Em Progresso
Protists-Phaeophyceae	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Em Progresso
Prostists-Rhodophyta	<i>Corallina pilulifera</i>	Em Progresso
Prostists-Rhodophyta	<i>Cyanidioschyzon sp.</i>	Em Progresso
Prostists-Rhodophyta	<i>Gracilaria andersonii</i>	Rascunho
Prostists-Rhodophyta	<i>Porphyra umbilicalis</i>	Em Progresso
Prostists-Stramenopiles	<i>Chattonella subsalsa</i>	Em Progresso
Protists-Stramenopiles	<i>Heterococcus sp.</i>	Em Progresso
Prostists-Stramenopiles	<i>Ochromonas danica</i>	Em Progresso
Prostists-Stramenopiles	<i>Ochromonas sp.</i>	Em Progresso
Prostists-Stramenopiles	<i>Paraphysomonas imperforata</i>	Completo
Prostists-Stramenopiles	<i>Pedinellales sp.</i>	Completo
Prostists-Stramenopiles	<i>Pelagophyceae sp.</i>	Completo
Prostists-Stramenopiles	<i>Schizochytrium aggregatum</i>	Completo
Prostists-Stramenopiles	<i>Spumella sp.</i>	Em Progresso
Synurophyceae	<i>Synura petersenii</i>	Em Progresso
Synurophyceae	<i>Tessellaria volvocina</i>	Em Progresso
Xanthophyceae	<i>Tribonema aequale</i>	Em Progresso
Xanthophyceae	<i>Vaucheria litorea</i>	Em Progresso

Fonte : Pagani *et al.*, 2012.

Tudo isso nos permitiu otimizar diferentes métodos de transformação genética, que vem sendo testados e alcançados com sucesso. Para uma maior eficiência dessas técnicas é necessário conhecer a espécie que será transformada, em especial o seu genoma, o que nos permite fazer uma otimização da sequência

de códons do DNA que será introduzido na célula alvo, aumentando tanto a aceitação no genoma hospedeiro quanto ao reconhecimento e expressão pela maquinaria da célula. Dentre os métodos mais utilizados para a introdução do material exógeno estão: a agitação com microesferas de vidro ou com *silicon carbide whiskers* (Kindle, 1990; Dunahay, 1993), eletroporação (Chow and Tung, 1999; Maruyama *et al.*, 1994), bombardeamento de micropartículas ou biobalística (Apt *et al.*, 1996; Falciatore *et al.*, 1999; Zaslavskaia *et al.*, 2000) e transferência mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Cheney *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2004).

As estratégias metabólicas utilizadas são inúmeras. Dentre as mais comuns estão a superexpressão, o silenciamento ou modificação da sequência de genes específicos do metabolismo, ou até mesmo a introdução de genes provenientes de outros organismos. O uso de plasmídeos como vetores de introdução da modificação gênica é a técnica empregada na maioria dos casos, sendo bem eficiente (Dunahay, 1993; Sun *et al.*, 2008; El-Sheekh, 1999; Maruyama *et al.*, 1994). Para essa finalidade é indispensável que os plasmídeos carreguem também um gene de resistência a um antibiótico a que o organismo é, em condições normais, susceptível, dessa forma nos permitindo selecionar as células que receberam o vetor introduzido.

A utilização de ferramentas tanto na área de engenharia bioquímica como genética vêm sendo empregadas com notável sucesso para o aumento da produção de lipídios em diversas espécies. Assim, o estudo das vias de biossíntese e de vias que influenciem na produção de lipídeos, com a utilização dessas ferramentas, se torna cada vez mais uma alternativa atrativa e promissora. E dentro deste campo, a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* tem sido o foco da investigação genética e

molecular por muitas décadas, sendo quase todas as técnicas desenvolvidas para essa espécie.

1.3.2 *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo

Antes de entrar no contexto sobre os experimentos realizados com essa microalga, serão abordadas algumas características gerais desse organismo que vem sendo tão amplamente estudado nas mais diversas áreas da ciência.

A microalga unicelular *C. reinhardtii* tornou-se um organismo modelo para o estudo de fotossíntese, estrutura e formação flagelar, biogênese das organelas e interações célula-célula durante o acasalamento (Harris, 2001). Tornou-se o organismo preferido para estudar a fotossíntese, devido à sua capacidade de crescer tanto fotossinteticamente quanto não fotossinteticamente em acetato como fonte de carbono, permitindo assim, a seleção de transgênicos incapazes de realizar fotossíntese (Harris, 2001). Sua capacidade de crescer não fotossinteticamente, necessidade de meio de cultura simples, o tempo de duplicação curto, genética bem caracterizada e disponibilidade de uma grande coleção de transgênicos tem atraído muitos pesquisadores a trabalhar com *Chlamydomonas*. A publicação da sequência completa do genoma (Lindahl *et al.*, 1995) e a capacidade de manipular todos os três genomas (nuclear, cloroplastos e mitocôndrias) de *Chlamydomonas* tem gerado muito interesse no desenvolvimento de aplicações biotecnológicas desse organismo. A seguir será apresentada uma breve introdução sobre este organismo baseada em Harris (2001).

As espécies do gênero *Chlamydomonas* são algas unicelulares clorófitas que possuem uma parede celular distinta, um único e grande cloroplasto e dois flagelos anteriores. *C. reinhardtii* tornou-se a espécie de laboratório mais popular do gênero,

principalmente por causa de sua capacidade de crescer não fotossinteticamente utilizando acetato como fonte de carbono. O tamanho médio das células é cerca de 10 μm , embora uma variação significativa seja observada durante o ciclo celular.

Outra característica de *C. reinhardtii* é a presença de dois flagelos anteriores que possuem de 10 a 12 μm de comprimento. Os flagelos são originários a partir de um par de corpos basais localizadas abaixo da extremidade apical da célula. A estrutura e formação flagelar de *C. reinhardtii* tem sido estudado extensivamente e um grande número de transgênicos com defeitos de motilidade foram isolados. Mais de 40 genes que codificam para os componentes dos flagelos foram clonados e sequenciados na *C. reinhardtii* e homólogo de alguns destes genes foram identificados em animais (Minko *et al.*, 1999; Mussnug *et al.*, 2005; Nagaya *et al.*, 2010).

O cloroplasto único de *Chlamydomonas* que ocupa cerca de dois terços do volume da célula, fez deste organismo um modelo para o estudo da biogênese do cloroplasto e fotossíntese. Devido à sua capacidade de crescer não fotossinteticamente, *Chlamydomonas* tem sido amplamente utilizado para estudar o papel das proteínas D1 e D2 do fotossistema II, biossíntese de clorofila, a análise genética da cadeia de transporte de elétrons e, síntese e formação do complexo do citocromo b6/f. O longo genoma de 195Kb do cloroplasto foi sequenciado. A transformação dessa organela é realizada através do bombardeamento de partículas e os transgenes se integram no genoma por recombinação homóloga, diferente do núcleo. Além de terem sido isolados vários transgênicos de biogênese do cloroplasto e fotossintéticos, diversos transgenes incluindo um anticorpo de cadeia simples (Lenz *et al.*, 2007) e ácido glutâmico descarboxilase humana (Romoren *et al.*, 2002) foram expressos em cloroplasto de *Chlamydomonas*. Uma importante organela

associada ao cloroplasto é o *eyespot*, que está localizado no interior da membrana do cloroplasto na parte equatorial da células. Esta estrutura é rica em pigmentos carotenóides e aparece como uma mancha laranja brilhante em microscópio de luz. Transgênicos com ausência de *eyespot* mostram redução de fototaxia.

O envelope nuclear, assim como em organismos superiores, é contínuo com o retículo endoplasmático (ER), porém a rede não é tão extensa. Dois vacúolos contrácteis são encontrados na extremidade anterior da célula. As mitocôndrias são distribuídas por toda a célula. O genoma mitocondrial possui apenas 15.8 kb de tamanho e contém apenas alguns genes. Transgênicos com deleção do gene *cob1* mitocondrial, que codifica para o citocromo b, não conseguem crescer em acetato no escuro, mas pode crescer fotossinteticamente. O genoma mitocondrial *Chlamydomonas* também pode ser manipulado utilizando-se a técnica de bombardeamento de partículas (Osta *et al.*, 2004).

A parede celular de *Chlamydomonas* consiste principalmente de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e deficiente em celulose. Genes que codificam diversos componentes de parede celular vêm sendo identificados e um número de transgênicos com defeitos na sua estrutura vem sendo isolados. Esses transgênicos com defeito na parede celular tornaram-se uma ferramenta muito importante para a manipulação genética de *Chlamydomonas* porque a presença de poros na parede permite a fácil entrada e integração de DNA exógeno no genoma nuclear, aumentando assim a eficiência de transformação. A observação de que esses poros também permitem a liberação de proteínas periplasmáticas no meio extracelular também tem gerado um grande interesse no uso desses transgênicos para a produção e secreção de proteínas exógenas no meio, o que facilita a purificação das

mesmas. Um esquema com todas as informações presentes acima está representado pela Figura 15.

Figura 15: Esquema da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. (modificado de www.microbe.com, acesso em 01/04/14).

O genoma nuclear de *C. reinhardtii* consiste em 16 cromossomos e cerca de 1×10^8 pares de bases. Esse genoma é rico em GC, representando 64% das bases totais (Livak e Schmittgen, 2001). Transformação nuclear de *Chlamydomonas* pode ser facilmente realizada utilizando algumas técnicas que foram citadas na sessão anterior (1.3.1.B). A integração do transgene no genoma nuclear ocorre por recombinação não homóloga. Para facilitar a expressão do transgene ele é normalmente flanqueado por regiões promotoras 5' e UTR 3' endógenas de *Chlamydomonas*. A seleção dos transformantes geralmente é realizada com genes de resistência a antibióticos ou complementando as linhagens transgênicas

(arginina-dependentes ou transgênicos para nitrato redutase) com genes tipo selvagem arginina succinato liase (*arg7*) ou nitrato redutase (*NIT1*).

Por todas as vantagens apresentadas e pelo fato de possuir o genoma nuclear, mitocondrial e do cloroplasto disponíveis, *C. reinhardtii* se tornou um importante organismo no que diz respeito à engenharia genética para diversos fins.

Para aumento direto na via de biossíntese de lipídeo, diversas enzimas relacionadas a essa via tiveram sua expressão alterada e efeitos positivos foram alcançados em muitos dos casos (Courchesne *et al.*, 2009). Outra estratégia que pode ser utilizada para aumentar a quantidade de lipídeo é o bloqueio da síntese de amido. Esta estratégia também já foi utilizada e resultados excelentes foram conseguidos, chegando ao aumento de 10 vezes na quantidade de TAG produzidos (Li *et al.*, 2010). Outras maneiras indiretas para aumento de biomassa como aumento da eficiência fotossintética e manipulação de enzimas relacionadas à absorção de CO₂ também já foram testadas em *C. reinhardtii* (Radakovits *et al.*, 2010).

Depois de tantos estudos realizados, a procura de novos genes alvo para a manipulação genética em busca de um fenótipo ainda melhor para a produção de biocombustível tem sido enorme. Transcriptomas de *C. reinhardtii* em situações onde a alga acumula grande quantidade de lipídeo, como em escassez de nutrientes, foram analisados e apresentaram diversos genes relacionados diretamente ou indiretamente à biossíntese de lipídeos. Dentro deste contexto, os genes exclusivos do ciclo do glioxilato se destacam em alguns trabalhos como sendo expressos em situações de grande acúmulo de lipídeo (Nguyen *et al.*, 2008; Toepel *et al.*, 2011). Este fato torna essas enzimas extremamente interessantes

para a manipulação genética e, no parágrafo seguinte, entraremos em detalhes sobre suas funções e sobre o ciclo do qual elas fazem parte: o ciclo do glioxilato.

1.4 O Ciclo do Glioxilato

O ciclo do glioxilato é uma via alternativa de metabolismo de acetil-CoA que permite, a partir da utilização do mesmo, a síntese de intermediários do ciclo do ácido cítrico e, indiretamente, de glicose. Além disso, em situações específicas, também está relacionado com a degradação de lipídeos de reserva para a síntese de carboidratos (Eastmond e Grahan, 2001). Essa via compartilha algumas enzimas com o próprio ciclo de Krebs, além de duas enzimas que são exclusivas dela, a isocitrato liase (icl) e a malato sintase (ms) (Kornberg, 1965). O ciclo do glioxilato, assim como o próprio ciclo do ácido cítrico, é iniciado com a condensação de uma molécula de acetil-CoA ao oxaloacetato para a formação de citrato, que depois é isomerizado a isocitrato. O isocitrato é clivado pela isocitrato liase em succinato e glioxilato. Os passos seguintes regeneram o oxaloacetato a partir do glioxilato. Primeiro, outra molécula de acetil-CoA é condensada com o glioxilato para formar malato pela ação da enzima malato sintase, que se assemelha à citrato liase do ciclo de Krebs. Finalmente, o malato é oxidado a oxaloacetato e o ciclo pode recomeçar (Lehninger *et al.*, 1993). O esquema da reação completa com as enzimas participantes e a equação geral da reação podem ser visualizados na figura 16.

Figura 16: Esquema do ciclo do glioxilato, as enzimas exclusivas desse ciclo (isocitrato liase e malato sintase) estão dentro das caixas amarelas (modificado de Berg *et al.*, 2002).

O ciclo do glioxilato, portanto, resulta na conversão líquida de duas moléculas de acetil-CoA a succinato, em vez de gerar quatro moléculas de CO₂ como aconteceria no ciclo do ácido cítrico. O succinato produzido na reação é transportado para a mitocôndria, onde entra no ciclo de Krebs e é convertido a malato, que possui dois destinos possíveis: (1) ser convertido a oxaloacetato na mitocôndria, continuando o ciclo do ácido cítrico e tornando a rota do glioxilato um processo anaplerótico; ou (2) o malato pode ser transportado ao citosol, onde é convertido a oxaloacetato para entrar na via da gliconeogênese (Lehninger *et al.*, 1993).

Figura 17: Esquema da interação entre as moléculas do ciclo do glicoxilato, ciclo de Krebs e a gliconeogênese. (Modificada de <http://www.biologyexams4u.com/2012/04/glyoxysomes.html>, acesso em 01/04/14).

As enzimas isocitrato liase e malato sintase, exclusivas dessa via e que possibilitam o ciclo do glicoxilato de ocorrer, conferem a uma variedade de plantas e micro-organismos algumas peculiaridades. Um ponto importante a ser destacado é a capacidade das sementes de plantas de mobilizar os TAG estocados, transformando-os em acetil-CoA e, com a entrada destes no ciclo do glicoxilato, formar glicose pela gliconeogênese. Além disso, essa habilidade de converter duas unidades de dois carbonos (acetil-CoA) em unidades de quatro carbonos (succinato) permite a esses organismos uma importante vantagem adaptativa: a de crescer utilizando o acetato como única fonte de carbono (Lehninger *et al.*, 1993).

Considerando a importância dessa via, a falta de informação na literatura sobre seu papel na biossíntese de TAG em microalgas, entre outras coisas que serão abordadas mais adiante, o estudo deste ciclo foi o foco principal desse trabalho. Com a modificação genética da espécie de microalga *C. reinhardtii*, tanto para superexpressão como para subexpressão das enzimas exclusivas desse ciclo, pudemos fazer importantes considerações sobre sua função e futuras aplicações. Como este trabalho está voltado para a otimização de microalgas para a produção de biocombustível, o foco principal foi o impacto dessas modificações genéticas no crescimento, na quantidade de outras importantes macromoléculas (proteínas totais, clorofila, polissacarídeos solúveis) e principalmente, na quantidade e qualidade dos ácidos graxos armazenados. Todos esses pontos, bem como todos os passos da escolha dos genes e das modificações genéticas, serão explicados e discutidos à diante.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliação da eficiência na produção e armazenamento de lipídios da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, a partir de diferentes estratégias tanto na área de engenharia genética, como na área de engenharia bioquímica, com a finalidade da obtenção de novos genes alvos para aplicação no setor de biocombustíveis.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de linhagens transgênicas para as enzimas-chave do ciclo do glioxilato (isocitrato liase e malato sintase) de *C. reinhardtii*;
- Avaliação do impacto da escassez de nitrogênio nos transgênicos;
- Seleção dos transgênicos que apresentarem maior quantidade de lipídeos neutros;
- Análise da expressão desses genes nos transgênicos que apresentarem maior quantidade de lipídeo;
- Extração e análise da quantidade e do padrão de ácidos graxos dos transgênicos;
- Análise do impacto das mutações no crescimento, quantidade de proteínas totais, polissacarídeos totais e clorofila a;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura e condições de crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii*

A condição de cultura da alga, baseia-se no crescimento das células em 100mL de meio de cultura TAP (Harris, 1989), suplementado com 100 µg/mL de arginina quando necessário. A iluminação foi continua com 80 µmol de fótons m⁻² sec⁻¹, e os *erlenmeyers* foram agitados em *shaker* a 120 rpm em uma temperatura de 23°C ± 1.

Foi utilizada a cepa de *C. reinhardtii* CC424, a qual é transgênica e possui deficiência na parede celular, requer arginina para seu crescimento e o antibiótico de resistência é a paromomicina. Todas as informações e referências da cepa de *Chlamydomonas* utilizada neste projeto são encontradas no site Chamycenter (<http://chlamycollection.org/>, acesso em 20/04/2014).

3.2 Análise das sequencias das enzimas (isocitrato liase e malato sintase)

As sequências de DNA das proteínas de interesse deste projeto, icl e ms, foram retiradas do banco de dados de sequências do GenBank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, acesso em 20/04/2014). A partir de um estudo da literatura (UniProtKB/Swiss-Pro, Brenda e GenBank) foram determinadas as sequências de DNA de cada proteína, as quais foram utilizadas na construção dos plasmídeos. O número das sequências do genbank para icl é XM001695279.1 e para ms é XM_001695580.1.

3.3 Construção dos plasmídeos

A construção dos plasmídeos foi realizada utilizando o software Vector NTI[®]Express, Invitrogen, EUA. As sequências de DNA das proteínas foram sintetizadas pela empresa Genewiz, Inc (Land, CA, EUA). As sequências foram

amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e inseridas no vetor pSL18 (Depege *et al.*, 2003) entre os sítios das enzimas NdeI e XbaI gerando os plasmídeos, pSL18ICL, pSL18MS, pSL18ICLanti e pSL18MSanti (seção 4.2). O promotor escolhido foi o psaD, um gene que não contém introns, mas codifica constitutivamente uma abundante proteína do fotossistema I (Fischer e Rochaix, 2001).

3.4 Transformações em bactérias

Após a síntese dos plasmídeos, estes foram introduzidos em bactérias competentes DH5 α utilizando o kit *Max Efficiency Competent Cells (Invitrogen Life Technologies, EUA)*. As transformações em células competentes foram realizadas com o objetivo de replicar os plasmídeos pSL18 com os genes de interesse, e assim consequentemente, obter maior quantidade de plasmídeos para as transformações nucleares em *Chlamydomonas*. Além disso, estoque de bactérias transformadas contendo o plasmídeo pSL18 com os genes de interesse foi armazenado em glicerol 50% a uma temperatura de -80 °C.

No protocolo de transformação utilizou-se 10 ng/ μ L de cada plasmídeo com o gene de interesse para transformar 25 μ L de uma solução contendo as bactérias. As células foram descongeladas em gelo durante 30 minutos e em seguida expostas a uma temperatura de 42 °C por 90 segundos e novamente expostas 2 minutos em gelo garantindo a entrada do plasmídeo nas células através da flexibilidade da parede celular induzida pela diferença da temperatura. Após as transformações foi realizada a extração do DNA plasmidial. Colônias de bactérias resistentes à seleção pelo antibiótico foram inoculadas em 2,5 mL de meio LB (Lurina-Bertani: NaCl, bactotripton, extrato de levedura) contendo a concentração ideal de antibiótico

(Sambrook *et al.*, 1989) e incubadas durante 16-20 horas a 37°C em agitação continua. Após este período, 1,5 mL de células foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 12000 x g por 1 minuto, à temperatura ambiente. Ao precipitado, adicionou-se 300 µL de solução Tris 10 mM pH 8 e EDTA 1mM e 10µg/mL de RNase A, em seguida adicionou-se 300 µL de solução de lise (NaOH e SDS 1%), sob forte agitação. Foi adicionado 300 µL de solução KOAc 5M durante 5 minutos. Através da agitação dos tubos foi gerado um precipitado ao qual este foi removido. O sobrenadante foi purificado através de fenol:clorofórmio:álcool-isoamilico na proporção de 25:24:1. Foi realizada a centrifugação e em seguida a fase aquosa (superior) foi transferida para novo tubo e o DNA foi precipitado com isopropanol em volume duas vezes maior do que a fase aquosa. O precipitado foi lavado com etanol 70% e então ressuspenso em 40uL de água. Alíquotas das amostras foram medidas no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Agilent, EUA) para medir a concentração dos plasmídeos.

3.5 Digestão dos plasmídeos

Para conferir se as bactérias receberam os plasmídeos corretamente (pSL18ICL, pSL18MS, pSL18ICLanti e pSL18MSanti), as amostras foram submetidas digestões com duas diferentes endonucleases de restrição (NdeI e KpnI). No processo de digestão foi utilizado o kit comercial da Invitrogenlife Technologies, EUA. Duas a três unidades de NdeI cliva 1 µg de DNA a 1 hora a 37°C e KpnI cliva 1 µg de DNA com uma unidade de enzima a 1 hora a 37°C. Ambas as enzimas foram utilizadas concomitantemente em tubos de 1,5 mL *ependorf* para cada plasmídeo.

3.6 Linearização com KpnI e purificação dos plasmídeos

No processo de linearização, foi utilizada a endonuclease KpnI, pois o seu sítio de restrição é único e não corta nenhuma sequência importante do plasmídeo, que poderia ser prejudicial ao evento de inclusão do gene ao DNA da alga. O evento de linearização é um evento relevante, pois há maior eficiência de inclusão do DNA exógeno (plasmídeo com o gene de interesse) no material genético da célula. O kit comercial utilizado na linearização foi o da Invitrogenlife Technologies, EUA. Após linearização as amostras foram purificadas para remover reagentes excedentes que poderiam interferir nas transformações. O kit utilizado na purificação dos plasmídeos linearizados foi o prep Spin Miniprep Kit, Quiagen, Alemanha.

3.7 Transformação genética das microalgas

Transformações em células de *C. reinhardtii* foram realizadas através do método de agitação com microesferas de vidro baseando-se no trabalho de Kildle *et al.*, (1990). Uma cultura de 100 mL de células a uma concentração de 10^6 células/mL serão centrifugadas e o sobrenadante ressuspendido em 1mL de meio TAP com 40mM de sacarose. À um tubo de microcentrífuga contendo 300 mg de microesferas de vidro lavadas com ácido e estéreis, foram acrescentados 300 uL das células em TAP-sacarose, 100 uL de polietileno glicol (PEG) 20% e 2 µg de plasmídeo linearizado. Essa mistura será homogeneizada em vortex e depois colocada em 5 mL de meio TAP por 16 horas sob agitação para recuperação das células. Após esta etapa as células serão plaqueadas em meio TAP-ágar contendo paromomicina 50 µg/uL para seleção das colônias contendo o plasmídeo de interesse.

3.8 Seleção de clones positivos através de PCR convencional

Os clones que foram positivos, aqueles que cresceram após transformações sob as placas contendo antibiótico para seleção (paramomicina), foram replaqueados, numerados e identificados. Seguidamente os clones selecionados foram submetidos à extração de DNA e PCR convencional. Colônias independentes foram coletadas e submetidas a 40 µL de solução Chelex 5% (Sigma, EUA), que é capaz de separar compostos através de permuta iônica. As colônias em Chelex 5% foram aquecidas a uma temperatura de 98°C por 10 minutos para separação do DNA que permanece na parte superior aquosa. Cerca de 2µL de amostras foram adicionadas as reações de PCR utilizando o *kit Hot-Start Taq™ Blue DNA Polymerase* (Denville Scientific, EUA). Dois pares de *primers* específicos para cada gene foram utilizados para comprovar se o plasmídeo foi integrado no núcleo da célula. O primeiro par de *primer* abrange uma parte do promotor do plasmídeo, e o segundo par abrange parte do gene. A tabela a seguir representa todos os *primers* desenhados para cada gene. O programa de PCR utilizado nas reações foi: 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C a 62°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e temperatura de extensão, 72°C por 10 minutos.

Tabela 9: *Primers* utilizados para a PCR convencional com objetivo de confirmar os clones positivos.

Gene	<i>Primer Foward</i>	<i>Primer Reverse</i>
<i>icl</i>	5'GGTTTCCTCGCCGAGGCAACCAGGG3'	5'AAGCTGCTTGCCTACAACCTGCTCGG3
<i>ms</i>	5'GGTTTCCTCGCCGAGGCAACCAGGG3'	5'TCTGCTGTGTGGCAGTGGGTGCGGC3'

3.9 Análise da expressão gênica

3.9.1 Extração de RNA

Ao sétimo dia de crescimento, 15 mL de cultura foram centrifugados por 2 minutos a 2.500 g e os precipitados foram imediatamente estocados a -80°C até o dia da extração. A extração de RNA foi realizada com o *PureLink® Plant RNA Reagent* (Ambion®) de acordo com recomendações do fabricante para extração de RNA em larga escala.

3.9.2 Bioalalyzer (Agilent)

Este equipamento permite a avaliação de amostras com concentrações de RNA entre 0,5 e 50 ng/uL. A matriz do gel aplicada nos capilares do chip utilizado na técnica contém uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos ao marcador de tamanho e ao RNA resulta na emissão de fluorescência que é quantificada, permitindo a separação do rRNA e a verificação de sua integridade. O protocolo foi realizado de acordo com recomendações do fabricante (Agilent).

3.9.3 RT-PCR

A confecção de cDNA foi realizada com o SuperScript® III First-Strand Synthesis (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. Utilizando-se 2uL do cDNA confeccionado foram realizados ensaios de PCR convencional como descritos na seção 4.9 e posterior análise em gel de acagore 1,2% para visualização do produto. As sequências de iniciadores utilizadas para cada gene (*actina* como controle interno, *icl* e *ms* como genes alvo) estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10: *Primers* utilizados para a confirmação da síntese de cDNA pela técnica de RT-PCR.

Gene	Primer Foward	Primer Reverse
<i>Actina</i>	5'CATTGCCGACCGCATGAGCAAG3'	5'ACTTCCGGTGCACGATCGAG3'
<i>icl</i>	5'AACTGCTCGCCCTCTTTCAAC3'	5'CCTGGGTGATGACGGTGCT3'
<i>ms</i>	5'TGCCCATCCACAACCTCATG3'	5'GGTACTTGGAGCGGGCGAA3'

3.9.4 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado adicionando-se 100ng de cDNA em triplicatas técnicas e biológicas e utilizando-se o *SYBR® Green PCR Master Mix* no equipamento Step One Plus™, ambos da Applied Biosystems®, de acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* utilizados estão descritos na sessão 4.10.3, e o gene normalizador da reação foi o da actina.

3.10 Análise fenotípica

Basicamente um bom fenótipo se restringe a duas condições. Primeiramente os transgênicos devem possuir ótima taxa de crescimento, ou seja, a alga que carrega o gene de interesse não pode ter perda de biomassa em relação a alga controle. A segunda condição esta relacionada com a quantidade de lipídeos que a alga produz, isso significa que o transgênico com o gene de interesse deve aumentar a quantidade de lipídios em relação a alga controle.

Todos os clones positivos deverão previamente serem submetidos as análises de crescimento e quantidade de corpos lipídicos. Para isso, é necessário analisar a razão do crescimento através da Densidade Óptica (DO). Os clones positivos juntamente com o controle foram inoculados em 5mL de meio TAP e meio

TAP sem nitrogênio (escassez de nitrogênio). Durante sete dias foram realizadas medidas diárias de O.D, começadas em 0,03. Durante a fase log e estacionária foram medidos corpos lipídicos intracelulares, através da técnica de *Nile Red* (Sigma, EUA) e após coletadas e liofilizadas no sétimo dia as amostras foram analisadas em CG/EM.

3.10.1 Análise da quantidade de lipídeos neutros pela técnica de *Nile Red*

Essa técnica foi otimizada pelo grupo do Dr. Richard Sayre, Laboratório Nacional de Los Alamos, NM, EUA, e ainda não se encontra disponível na literatura. A marcação dos corpos lipídicos foi realizada através do corante fluorescente *Nile Red* ao terceiro e ao sétimo dia de crescimento em meio TAP completo e TAP sem nitrogênio. Para isso, em uma alíquota de 250 µl de células em meio TAP a uma DO de 0,4 foram acrescentados 2 µg/mL de solução de *Nile Red* diluída em dimetilsulfóxido. As células foram então encubadas a temperatura ambiente (25°C) no escuro por dez minutos antes de submetidas à quantificação de fluorescência no citômetro de fluxo BD Accuri® C6.

3.10.2 Extração e análise de ácidos graxos por CG-EM

Essa técnica foi otimizada pelo grupo do Dr. Richard Sayre, Laboratório Nacional de Los Alamos, NM, EUA, e ainda não se encontra disponível na literatura. Células liofilizadas da alga (5 mg) foram ressuspensas em 1,5 mL de 2,5% ácido sulfúrico em metanol. Foi adicionado a cada amostra um padrão interno de um ácido graxo C13:0, utilizou-se 20 µl de uma concentração de 10 mg/mL, seguidamente 0,5 mL de tolueno também foi adicionado. Todos os tubos foram incubados a uma temperatura de 90°C por 60 minutos. Após este procedimento os tubos foram resfriados a temperatura ambiente. Uma quantidade de 1mL de hexano e de água Milli-Q foi adicionado e novamente os tubos foram vortexados e centrifugados a

2000 x g por 5 minutos. Este último procedimento foi repetido quando necessário para clarificar a fase orgânica do material celular. A fase orgânica foi transferida para outro tubo (vial com tampa) para posterior análise em Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM) (GC/MS, Shimatzu QP2010, Japan). Padrão puro de ácidos graxos livres, Supelco 37 (Sigma, EUA), foi utilizado na identificação e quantificação dos ácidos graxos, o qual foi baseado na comparação dos tempos dos picos de retenção das amostras e dos padrões, sob mesmas condições de eluição. Para a quantificação de cada ácido graxo identificado, uma curva padrão foi construída a partir do Supelco 37. Adicionalmente foi utilizada a biblioteca de ácidos graxos que vem acoplada ao software do CG-EM para identificação dos ácidos graxos. A coluna utilizada nas corridas das amostras foi a VF-WAXms, 0,25 mm x 0,3 µm x 30 m (Agilent, EUA), específica para separação de ácidos graxos. Após corrida no CG/EM, o *software* do aparelho apresenta os resultados das áreas de cada espectro em uma planilha de dados numérica. A partir destes dados é realizada a média e desvio padrão das triplicatas. Os cálculos das concentrações foram baseados na curva de calibração do Supelco 37, obtida pelo método de regressão linear para cinco pontos medidos em triplicata. A área medida de cada ácido graxo é dividida pela área do padrão e multiplicada pela concentração do mesmo (mg/mL). Em seguida, multiplica-se a concentração obtida pelo volume total do solvente utilizado (hexano + tolueno) e pelo fator de diluição da injeção da amostra no aparelho. O resultado obtido desta forma representa a massa em mg de ácido graxo produzido. Finalmente, dividimos o resultado pela biomassa total seca utilizada na extração (5 mg), obtendo no final, mg de Ácido Graxo / g de massa seca.

3.10.3 Proteínas solúveis totais

A alga liofilizada (10 mg) foi suspensa em 100 mL de tampão de extração (0,2M de tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA e 1 mM DTT) e o extrato bruto foi centrifugado a 12.000 x g (4 °C, durante 20 min). A concentração das proteínas solúveis totais foi determinada por espectrofotometria a 595 nm, após adição de solução para ensaio protéico da Bio-Rad, de acordo com o método de Bradford (1976). A quantificação das proteínas solúveis totais foi realizada de maneira relativa, considerando-se 1 a concentração de proteína das algas selvagens e calculando-se o valor respectivo para a alga transgênica.

3.10.4 Carboidratos solúveis totais

A alga liofilizada (15 mg) foi suspensa em 1 mL de etanol 70% até a obtenção de um homogeneizado. A solução foi incubada em banho-maria por 3h a 70 °C e, em seguida, centrifugada a 5000 x g durante 5 minutos (Karsten *et al.*, 1999). A concentração de carboidratos solúveis totais foi determinada por espectrofotometria a 490 nm após a adição de 5 mL ácido sulfúrico a 95% e fenol (5%), segundo o método colorimétrico do ácido fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). A quantificação das carboidratos solúveis totais foi relativa, considerando-se 1 a concentração das algas selvagens e comparando-se com as transgênicas.

3.10.5 Clorofila a

A medição da intensidade da clorofila a foi realizada ao terceiro e ao sétimo dia de crescimento em meio TAP completo e TAP sem nitrogênio. Para isso, em uma alíquota de 250 µl de células em meio TAP a uma DO de 0,4 foram submetidas à quantificação de fluorescência no citômetro de fluxo BD Accuri® C6.

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como valores médios $\pm$ desvio padrão (DP). Os resultados foram testados com um $p=0,05$ comparando as médias dos valores obtidos para o controle (triplicata) e para os experimentos testados, aplicando o teste de múltipla comparação ANOVA para identificar pares de grupos com diferenças estatísticas significativas. Os testes estatísticos foram realizados no software estatístico R.

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos gerais da manutenção e cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Inicialmente caracterizamos o crescimento da espécie em nosso laboratório para ver se a espécie estava se comportando de forma condizente com a literatura. A cepa CC424 da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* nos foi gentilmente cedida pelo laboratório do professor Richard Sayre, Laboratório Nacional de Los Alamos, NM, EUA. A espécie foi recebida em meio TAP sólido e desta mesma maneira mantida como estoque, uma vez que não possuímos protocolo efetivo para sua criopreservação.

As curvas de crescimento iniciais foram realizadas a partir da inoculação de pequena amostra de células da placa contendo meio TAP sólido em meio TAP líquido, através de uma leve raspagem da placa. A medição da absorbância em 750 nm foi realizada uma vez por dia e, como complementação também foi confirmada pela metodologia de contagem através da câmara de Neubauer.

Os resultados da curva de crescimento tanto por contagem celular, como por DO podem ser visualizados nos gráficos da Figura 18. A medição da curva de crescimento foi realizada ao longo de 8 dias. As algas entraram em fase exponencial no dia 2 e em fase estacionária no dia 5.

Figura 18: Gráficos da curva de crescimento da linhagem transgênica de *Chlamydomonas reinhardtii* ao longo de oito dias. (A) Curva realizada com a medida da DO a 750nm. (B) Curva realizada com contagem celular em câmara de Neubauer.

Como dito nos materiais e métodos, todos os cultivos desta primeira etapa do trabalho foram realizados em triplicata em *erlenmeyers* de 250 mL com volume líquido de 100 mL, mantidos em agitador a 120 rpm e sob luz constante. A agitação é importante, uma vez que durante o período iluminado a alga irá precisar do CO₂ para realização de fotossíntese. Dessa forma, com o auxílio da agitação, o carbono fixado pela alga durante este processo encontra-se naturalmente dissolvido no meio líquido a partir do CO₂ atmosférico. Já durante o período de ausência de luz, a alga possui a capacidade de assimilar o acetato do meio de cultura como fonte de carbono e crescer de maneira heterotrófica. Isto só é possível pela presença do ciclo do glioxilato como já descrito anteriormente.

4.2 Construção das linhagens transgênicas: análise das sequências dos genes (*isocitrato liase* e *malato sintase*) para a construção dos plasmídeos.

4.2.1 Superexpressão dos genes:

A. Isocitrato liase

Para achar a sequência correta do gene que codifica a proteína icl, foi utilizada a ferramenta de busca do site do NCBI. Apenas um gene para esta proteína foi encontrado (número de identificação: 5720950). Após encontrar o gene, procuramos pela sequência da proteína (número de identificação: XP_001695331.1) e seu respectivo cDNA (XM_001695279.1). A sequência de cDNA do gene endógeno de *C. reinhardtii* utilizada para superexpressão pode ser visualizada a seguir:

```
ATGGCCTCCAACGGCGCTGCCCCGGACCGCTGGTCGAACGTGAAGCGTGTGTA
CACACGCCAGGATGTGGAGAAGCTGCGTGGCTCCATCAAGATCGAGTATACCC
TCGCGCGACTGGGCGCCGAGAGGTTTTGGAATCTGCTGCACACGGAGGACTAC
GTCCCCGCCCTTGGCGCCATGACCGGCGGCCAGGCTGTGGAGATGGTCGCCG
CCGGCCTCAAGGCCATCTACCTATCGGGCTGGCAGGTCGCCGCCGACGCCAA
CTCGGCTTCGCAGACCTACCCCGACCAGTCCCTGTACCCAGTGGACTCCGTGC
CCCGGGTGGTTTTCCCGCATCAACAACGCCTTCCAGCGCATGGACCAGATGCAG
CACTCTGAGGGCCGCGGCGACACGTACTGGTTTGCGCCCATTGTGGCGGACG
CCGAGGCCGGCTTCGGCGGCAACCTGAACGCATACGAGCTGATGAAGGCGCT
GATCGAGGCCGGCGCCTCCTGCGTGCACTTCGAGGACCAGCTGGCCAGCGCC
AAGAAGTGCGGCCACCTGGGCGGCAAGGTGCTGGTGCCACCAAGGAGTTTCG
TGCAGAAGCTGACGGCGGCGGGCTGGCGGCGGACGTGATGGACGTGCCAC
CCTCATCATTGCGCGCACGGACGCGCTGGGCGCCTACCTGCTCACCAGCGACG
```


CCGACGAGTACGACAAGCCCTTCATGACCGGCGAGCGCACTGCCGAGGGCTTT
 TACTGCGTGCGCGGGCGGCATTGACGCCGCCATTGCCCCGCGGCCTGGCCTATG
 CGCCCTACGCCGATCTGGTGTGGTTTGAGACCAGCGAGCCGTCCATGGAGGAG
 GCCAAGAAGTTCGCCGCCGCCATCCACGCGCAGTACCCCGGCAAGCTGCTTGC
 CTACAACTGCTCGCCCTCTTTCAACTGGAAGAAGAAGCTGAGCGACGACGAGAT
 TGCCAAGTTCCAGAAGACGCTGGGCTCGCTGGGCTACAAGTTCCAATTCATCAC
 GCTGGCCGGCTTCCACTCGCTCAACTACGGCATGTTCAGCCTGGCCCGCGACT
 ACGCCTCGCGCGGCATGAGCGCGTATGCGCAGCTGCAGGAGGCGGAGTTTGC
 CAGCGAGAAGCAGGGCTACCGCGCCACCACACACCAGAAGTTTGTGGGCACG
 GGCTACTTCGACCTGGTCAGCACCGTCATCACCCAGGGCACCTCGTCCACCAA
 CGCGCTCAAGGGCAGCACGGAGGAGGAGCAGTTCCACCACTGA

Essa sequência de cDNA foi introduzida no vetor pSL18 entre os sítios de restrição das enzimas XbaI e NdeI. Na Figura 19 pode ser visto o mapa desse plasmídeo. Além de possuir os genes de seleção para ampicilina (seleção em bactéria) e paromomicina (seleção na microalga), esse plasmídeo também conta com um promotor constitutivo: o Psad. Este, por sua vez, é um promotor presente em uma proteína essencial do fotossistema I, sendo altamente expressa a todo o momento na célula. Por este motivo, a inserção das sequências para que sejam controladas por este promotor forte, alterará a expressão deste gene de maneira positiva, causando o que chamamos de superexpressão.

Figura 19: Mapa do plasmídeo pSL18 com os sítios de restrição únicos.

Após a escolha do vetor, a análise dos sítios de restrição do mesmo, e a inclusão do cDNA da *icl* entre os sítios únicos de restrição *XbaI* e *NdeI*, os plasmídeos foram checados. Inicialmente, foi realizada a digestão do plasmídeo com as enzimas *KpnI* e *NdeI*, o que resultou em dois fragmentos de 2.633 e 4.698 pares de base (Figura 20). Além da digestão também foi realizada uma linearização do plasmídeo com a enzima de restrição *KpnI*, para mais uma vez nos assegurar que a construção realizada correspondia ao esquema mostrado na Figura 20.

Uma PCR começando na sequência do promotor *PsaD* e terminando no cDNA do gene de *icl* foi realizada de maneira a confirmar a orientação correta da sequência. Um iniciador que anelava na metade da sequência promotora e um outro reverso que terminava no meio da sequência introduzida de *icl* nos mostrou um

fragmento aproximadamente 550 pares de base, como era o esperado (dados não mostrados).

Figura 20: A) Gel de agarose 1.2% mostrando a digestão com as enzimas de restrição de sítio único KpnI e NdeI e excisão do fragmento clonado no plasmídeo na canaleta 2, e o mesmo plasmídeo não digerido na canaleta 3. B) Linearização do plasmídeo com KpnI na canaleta 2 e o mesmo plasmídeo não digerido na canaleta 3. Nas canaletas de número 1 (A e B) estão representados os padrões de peso molecular de 1Kb. C) Esquema da construção do plasmídeo pSL18-ICL.

B. Malato sintase

A sequência correta do gene que codifica a proteína ms, foi achada utilizando-se a mesma ferramenta de busca utilizada para icl, NCBI. Também foi encontrado apenas um gene para esta proteína (número de identificação: 5721289). Após encontrar o gene, a sequência da proteína também foi identificada (número de identificação: XP_001695632.1), bem como seu respectivo cDNA (XM_001695580.1). A sequência de cDNA do gene endógeno de *C. reinhardtii* utilizada para superexpressão pode ser visualizada a seguir:

```
ATGTCCGTCCAAACCATTCGGGGTGTGGCTATCCTCGGGCCAGTCACCGCAGA
GCAGGCGAGCATCCTGTGCGCCAGAGGCCAGCTTTTCGTCGCGACGCTGCACC
GCACCTTCAACCCGCGCCGCAAGGAGTTGCTCAAGCGTCGCGATGAGCGCCAG
AAGGACCTGGATGCTGGGCGCCTGCCCCGACTTCCTGCCTGAGACGGCGGGCGG
TGCGCGCCGACCCCGGCTGGAAGTGCGCCCCGCCCCGCACCCGGCCTGGTGA
```

CCGGCGCGTGGAGATCACGGGGCCGGTGGACCGCAAGATGGTGATCAACGCC
CTCAACAGCGGTGCCACACAGTACATGGCCGACTTTGAGGACTCGCACGCGCC
CACGTGGGACGGCAACCTGGAGGGGCAGGTGAACATGCGTGACGCCGTGCGC
CGCGCCATCAGCTACACCGGACCCAACGGCAAGGTCTACAGCCTGCGCACTGA
CGGCAAGCTGGCCACGCTGCTGGTCCGCCCCCGCGGCTGGCATCTGGTGGAG
GCCCACTTCATGGTGGATGGCGAGCCCTGTTCCGCCTCGCTGTTGACTTCGG
CCTGTTCTTCTTCCACAACGCTGCCGCCACCCTAGCGGCCGGGCAGGGCCCCCT
ACTTCTACCTGCCCCAAGATGGAGAGCCATCTGGAGGCCAGGCTGTGGAACGAC
GTGTTCAACGCCAGCCAGGACATGCTGCGGCTGCCGCGCGGCACTGTGCGTG
CCACGGTGCTGATCGAGACGCTGCTGGCCGCCTTTGAGATGGAGGAGATCCTG
TACGAGCTGAGGGACCACTCGTCGGGCCTGAACTGCGGCCGCTGGGACTACAT
CTTCAGCTTCATCAAGAAGCTGCGCAACCACCCGCAGTTTGTGCTGCCAGACCG
CTCCGCCGTCACCATGACCTCGCCCTTCATGGACGCCTACGTGCGACTGCTCA
TCAAGACCTGCCACAAGCGCGGCGTGCACGCCATGGGCGGCATGGCGGCGCA
GATCCCCATCAAGGACGACCCCGCAGCAAACGCCGCCGCGCTGGCCAAGGTC
CGCGGCGACAAGGAGCGCGAGGTGGTGGCCGGGCACGACGGCACGTGGGTG
GCGCACCCCGCCCTGGTGCCCATCGCCATGGAGATTTTCAACAAGCACATGCC
CACGCCCAACCAGCTGCACGTGCGGCGCGACGACGTGACGGTGACGGCGCAC
AACCTGCTGGACGTGCGCGGCGGGGCGCTGCTGGCGGAGGGCGGCATCACG
GAGAAGGGTCTGCGCGACAACCTGTCGGTGGGCCTGGCCTACATGGAGAACTG
GCTGCGGGGCGTGGGCTGCGTGCCCATCCACAACCTCATGGAGGACGCCGCC
ACCGCCGAGATCAGCAGGTCTGCTGTGTGGCAGTGGGTGCGGCACCACGCGC
GCACTCGCGACGGCCGTGTGGTGACGGCGGCCTGGGTGAACGACCTGCTGGC
GCAGGAGCTGGACCAGCTGAAGAGCAAGATGGGCGCCGAGCGCTTCGCCCCG
TCCAAGTACCCTCTGGCTGCTCAGCTGTTCCAGAGCACCATCACCGGCGACGC

CTACTCGGACTTCCTCACCACCCTGTGCTATGACCACATCGTCACCAAGACCCC
CAGCCGCATGTGA

A construção do vetor pSL18 com o cDNA deste gene foi realizado sob as mesmas condições descritas para *icl*. Na figura 19, podemos observar os fragmentos de 2.633 e 5.085 pares de base liberados pela digestão das enzimas de restrição KpnI e NdeI, além da linearização do plasmídeo quando digerido com a enzima KpnI (Figura 21). Além disso, também verificamos a orientação do gene para ver se estava na direção correta a ser expresso. Este último resultado foi gerado por uma PCR realizada com a mesma abordagem da utilizada para *icl*, gerando um fragmento de aproximadamente 500 pares de base (dados não mostrados). O esquema do plasmídeo pSL18 contendo a sequência da *malato sintase* (pSL18-MS) pode ser visualizado no gel de agarose 1% mostrado na Figura 21. Fazendo uso da mesma abordagem, o intuito foi também a superexpressão desse gene, uma vez que sua transcrição também será controlada pelo mesmo promotor forte e constitutivo utilizado para *icl*, PsaD. O esquema do plasmídeo pode ser visualizado na Figura 21.

Figura 21: A) Gel de agarose 1.2% mostrando a digestão com as enzimas de restrição de sítio único KpnI e NdeI e excisão do fragmento clonado no plasmídeo na canaleta 2, e o mesmo plasmídeo não digerido na canaleta 3. B) Linearização do plasmídeo com KpnI na canaleta 2 e o mesmo plasmídeo não digerido na canaleta 3. Nas canaletas de número 1 (A e B) estão representados os padrões de peso molecular de 1Kb. C) Esquema da construção do plasmídeo pSL18-MS.

4.2.2 Subexpressão dos genes:

Neste trabalho a estratégia de subexpressão de genes utilizada foi a de RNA de interferência dsRNA (do inglês, *double strand RNA*). Uma sequência antisense de aproximadamente 350 pares de bases dos genes a serem subexpressos foi clonada no plasmídeo pSL18 utilizando-se da mesma abordagem já falada para a superexpressão. Com esta sequência antisense sendo altamente expressa, uma vez que o promotor constitutivo PsaD é forte, ela irá parear na sua respectiva sequência de mRNA, formando um RNA dupla fita. Este RNA dupla fita, por sua vez, irá seguir o mecanismo geral de degradação de dsRNA. Após a formação dessa molécula de RNA dupla fita, este é clivado pela enzima DICER (membro da família RNase III), em um processo dependente de ATP, em pequenas moléculas de aproximadamente 21 pares de base chamadas de siRNAs (*small RNAs*). Após a geração destas moléculas efetoras, elas são incorporadas a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), do qual a proteína Argonauta 2 (Ago 2) participa. Essa proteína é essencial no que diz respeito

à seleção da fita do siRNA que será incorporada ao complexo RISC, além de apresentar atividade de endonuclease dirigida contra a fita de mRNA alvo. Como a sequência de bases do siRNA é complementar à sequência de bases do mRNA alvo, o complexo RISC o cliva, degradando-o.

A seguir entraremos em detalhes sobre cada uma das sequências antisenso utilizadas e a construção dos respectivos plasmídeos.

A. Isocitrato liase

A sequência antisenso de *icl* foi determinada escolhendo-se um fragmento de 369 pares de base da região 3'do cDNA do gene de *icl*. Após determinada, foi necessário fazer um teste básico de alinhamento da sequência no genoma da alga, uma vez que não pode haver um pareamento inespecífico, caso contrário isso alteraria a expressão de genes que não são alvo desta pesquisa. Para isto, a ferramenta de busca do site do NCBI, blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 20/04/2014) foi utilizada e nenhum outro gene, além do gene *icl* do genoma da própria alga apresentou similaridade que pudesse trazer algum risco de pareamento inespecífico.

Após a verificação desta sequência, o programa *Reverse Complement* (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html, acesso em 20/04/2014) foi utilizado de maneira a transformar a sequência escolhida na sua sequência reversa complementar. A sequência utilizada pode ser visualizada a seguir:

```
GTGGTGGAAGTCTCCTCCTCCGTGCTGCCCTTGAGCGCGTTGGTGGACGAGG
TGCCCTGGGTGATGACGGTGCTGACCAGGTCTGAAGTAGCCCGTGCCACAAAC
TTCTGGTGTGTGGTGGCGCGGTAGCCCTGCTTCTCGCTGGCAAAGTCCGCCTC
CTGCAGCTGCGCATACGCGCTCATGCCGCGCGAGGCGTAGTCGCGGGCCAGG
CTGAACATGCCGTAGTTGAGCGAGTGGAAGCCGCCAGCGTGATGAATTGGAA
```

CTTGTAGCCCAGCGAGCCCAGCGTCTTCTGGAAGTTGGCAATCTCGTCGTCGCT
CAGCTTCTTCTTCCAGTTGAAAGAGGGCGAGCAGTTGTAGGCAAGCAGCTT

A construção do vetor pSL18 contendo a sequência do cDNA de *icl* foi realizado de forma igual às realizadas para a superexpressão, entre o promotor e o terminador PsaD. Na Figura 22, podemos observar os fragmentos de 2.633 e 3.816 pares de base liberados pela digestão das enzimas de restrição KpnI e NdeI, além da linearização do plasmídeo quando digerido com a enzima KpnI (Fig 22). Igualmente às construções anteriores, a orientação de entrada da sequência foi verificada para ver se estava na direção correta a ser expressa. Este último resultado foi gerado por uma PCR realizada com a mesma abordagem explicada anteriormente, um iniciador no promotor e outra na sequência, gerando um fragmento de aproximadamente 350 pares de base (dados não mostrados). O esquema do plasmídeo pSL18 contendo a sequência antisense do gene de *icl* (pSL18-ICLanti) pode ser visualizado na Figura 22.

Figura 22: A) Gel de agarose 1.2% mostrando a digestão com as enzimas de restrição de sítio único KpnI e NdeI e excisão do fragmento clonado no plasmídeo na canaleta 2, e o mesmo plasmídeo não digerido na canaleta 3. B) Linearização do plasmídeo com KpnI na canaleta 2 e o mesmo plasmídeo não digerido na canaleta 3. Nas canaletas de número 1 (A e B) estão representados os padrões de peso molecular de 1Kb. C) Esquema da construção do plasmídeo pSL18-ICLanti.

Mais uma vez todos estes procedimentos de checagem são imprescindíveis para uma segurança de se estar trabalhando com as sequências corretas, minimizando erros na interpretação dos resultados. Em uma abordagem diferente, agora com a superexpressão dessas sequências antisense, haverá um pareamento destas moléculas com as moléculas de mRNA presentes na célula, enviando esse mRNA para as vias de degradação. O resultado será uma baixa expressão do gene *icl*.

B. Malato sintase

No caso de *ms*, a sequência escolhida também é proveniente da parte 3'do cDNA do gene, porém pouco menor 255 pares de base. Essa diferença foi apenas por uma questão de quantidade de GC presente na sequência de cDNA. Uma vez que sequências ricas nestes nucleotídeos são conhecidas por causar muito pareamento inespecífico, é mais interessante ter uma sequência um pouco menor, porém com pouca quantidade de GC.

O alinhamento com o genoma da alga realizada pela ferramenta do blastn também não revelou nenhuma outra sequência de cDNA que pudesse apresentar risco de pareamento inespecífico. Após a verificação desta sequência, assim como para *icl*, o programa *Reverse Complement* foi utilizado de maneira a transformar a sequência escolhida na sua sequência reversa complementar. A sequência utilizada pode ser visualizada a seguir:

```
CATGCGGCTGGGGGTCTTGGTGACGATGTGGTCATAGCACAGGGTGGTGAGGA
AGTCCGAGTAGGCGTCGCCGGTGATGGTGCTCTGGAACAGCTGAGCAGCCAGA
GGGTACTTGGAGCGGGCGAAGCGCTCGGCGCCCATCTTGCTCTTCAGCTGGTC
CAGCTCCTGCGCCAGCAGGTCGTTACCCAGGCCGCGGTACCCACACGGCCG
TCGCGAGTGCGCGCGTGGTGCCGCACCCACTGCCACACAGCAGA
```

A construção do vetor pSL18 contendo a sequência do cDNA de *ms* foi realizado da mesma maneira que *icl*, sendo inserida na mesma posição. Na Figura 23, podemos observar os fragmentos de 2.633 e 2.890 pares de base liberados pela digestão das enzimas de restrição KpnI e NdeI, além da linearização do plasmídeo quando digerido com a enzima KpnI. A orientação de entrada da sequência confirmada pelo ensaio de PCR, bem como para todas as outras construções, gerando um fragmento de aproximadamente 250 pares de base (dados não mostrados). O esquema do plasmídeo pSL18 contendo a sequência antisenso do gene de *ms* (pSL18-MSanti) pode ser visualizado na Figura 23.

Figura 23: Gel de agarose 1.2% mostrando a digestão com as enzimas de restrição de sítio único KpnI e NdeI e excisão do fragmento clonado no plasmídeo na canaleta 2, e o mesmo plasmídeo não digerido na canaleta 3. B) Linearização do plasmídeo com KpnI na canaleta 2 e o mesmo plasmídeo não digerido na canaleta 3. Nas canaletas de número 1 (A e B) estão representados os padrões de peso molecular de 1Kb. C) Esquema da construção do plasmídeo pSL18-MSanti.

Da mesma maneira já explicada para a *icl*, nessa abordagem a intenção é a baixa expressão do gene *ms*. Por este motivo, a sequência antisenso foi colocada após o promotor PsaD para que moléculas de RNA antisenso sejam produzidas. Estas irão parear com o mRNA do gene *ms* e isso causará sua degradação e resultará em uma baixa expressão gênica da enzima malato sintase.

4.3 Transformação das algas:

Todos os componentes adicionados durante o experimento de transformação são indispensáveis para uma boa eficiência. A sacarose é importante para regular a osmolaridade do meio, deixando-o quase que isotônico com o citoplasma da célula (Shimogawara *et al.*, 1997). O PEG apresenta papel essencial na transformação das células intactas. Não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual ele causa esse aumento de até 100 vezes na eficiência da transformação, mas sabe-se que ele é indispensável para a ligação do DNA exógeno em volta das células (Kawai *et al.*, 2010). A linearização dos plasmídeos antes da transformação também é um fator que aumenta muito a eficiência. Em *C. reinhardtii* a integração do DNA exógeno ocorre de maneira randômica, dessa forma, a ponta livre do DNA plasmidial linearizado pode atacar com maior facilidade o DNA cromossômico causando sua integração no genoma.

Após adição de todos os componentes essenciais para uma transformação eficiente da alga, essas células foram agitadas em contato com as microesferas de vidro. Essas esferas causam lesões nas membranas das células, permitindo que alguns dos componentes do meio passem por poros formados pelas lesões para o interior da célula. É neste momento que o DNA plasmidial entra na célula e pode ser integrado ao cromossomo. Em linhagens onde as células apresentam parede celular, seria necessário acrescentar um componente que lisasse a parede celular para que o DNA pudesse permear, porém essa linhagem CC424 já possui uma mutação que a torna deficiente de parede celular, facilitando a entrada do DNA exógeno rumo ao interior da célula. Um esquema geral da transformação utilizada pode ser visualizado na figura 24. Após essa etapa as células foram colocadas em agitador automático em meio TAP por 16 horas para se recuperar das lesões e do

estresse causado pelo método de transformação. Somente no dia seguinte foram plaqueadas em meio TAP sólido contendo o antibiótico de seleção.

Figura 24: Esquema da transformação genética pelo método de microesferas de vidro (Kindle *et al.*, 1990). Nesse protocolo, a 1 ml de um concentrado de células ressuspensas em meio TAP com 40 mM de sacarose, foram adicionados PEG e os plasmídeos linearizados. Essa mistura foi agitada na presença das esferas de vidro que causaram poros na membrana, permitindo a entrada do DNA plasmidial e sua posterior integração ao genoma.

Seis diferentes construções foram realizadas, sendo quatro delas com apenas um dos plasmídeos, e duas delas transformações duplas, ou seja com dois dos plasmídeos construídos. Nas transformações simples, um plasmídeo contendo cada uma das quatro construções plasmidiais foi adicionado, com o objetivo de alterar a expressão de apenas um dos genes de interesse. A construção contendo o plasmídeo pSL18-ICL, estaria superexpressando o gene *icl* e a construção pSL18-

MS estaria aumentando a expressão do gene *ms*. Já as outras duas com os fragmentos antisenso de cada um dos genes, *icl* e *ms*, estaria diminuindo a expressão de cada um dos genes separadamente. Por outro lado, as construções duplas para superexpressão, estariam aumentando a expressão dos dois genes ao mesmo tempo, pois possui os dois plasmídeos de superexpressão, pSL18-ICL e pSL18-MS. Assim como a construção dupla para subexpressão também contém ambos os plasmídeos com a sequência antisenso, pSL18-ICL-anti e pSL18MS-anti, causando diminuição da expressão de ambos os genes concomitantemente.

A seleção dos transgênicos positivos foi realizada em duas etapas: na primeira delas foram selecionados todos os transgênicos capazes de crescer no antibiótico de seleção, e na segunda essas colônias resistentes foram testadas por PCR para ver se o gene de interesse estava presente.

Em um primeiro momento as colônias presentes nas placas de TAP contendo o antibiótico paromomicina foram repassadas para novas placas também contendo o antibiótico em mesma concentração. Isso foi repetido por três vezes em placas feitas em dias diferentes. Além desse controle, juntamente com as células que passaram pelo método de transformação, células não transformadas também foram plaqueadas em meio contendo paromomicina. Como nenhuma colônia cresceu nesta placa controle, chegamos à conclusão que todas as colônias repassadas para as novas placas e selecionadas realmente possuem a parte do plasmídeo que conferia resistência ao antibiótico. As colônias transgênicas que aparecerem após uma semana (Figura 25A), bem como a placa controle e um exemplo de uma placa onde as transgênicas selecionadas foram repassadas podem ser visualizadas na Figura 25B.

Figura 25: (A) Colônias transgênicas crescendo em placas contendo paromomicina após o sétimo dia do evento de transformação (B) Exemplo de colônias repassadas para as novas placas contendo o antibiótico paromomicina a uma concentração de 50 µg/mL. Cada colônia representa um transgênico diferente que foi selecionado em meio TAP sólido contendo paromomicina.

Na segunda etapa de seleção o objetivo era conferir se as colônias que adquiriram a parte do plasmídio capaz de conferir resistência ao antibiótico também adquiriram o gene de interesse. Para isso, realizamos extrações de DNA diretamente das colônias resistentes a paromomicina, de modo que este foi o material usado como *template* nas reações de PCR seguintes. As extrações foram realizadas em altas temperaturas (98 °C) em presença de chelex, uma resina que tem como função proteger a amostra contra DNases. Estas DNases poderiam permanecer presentes após a extração em alta temperatura e consequentemente destruir o DNA presente. Este mecanismo ocorre pois a resina chelex se liga a cátions, incluindo o Mg^{2+} . Como o Mg^{2+} é cofator das enzimas que degradam o DNA, essas enzimas ficam inativas, pela “ausência” desse elemento químico.

Para a realização da PCR, os mesmos pares de *primers* utilizados para a conferência das sequências dos plasmídeos (seção 3.9), foram usados nesta etapa. Nesta abordagem utilizamos um *primer forward* que se anelava na parte do promotor

PsaD é um *primer reverse* que se anelava na metade da sequência de interesse. Como foram utilizados os mesmo pares de *primers*, os fragmentos para cada uma das construções foram de mesmo tamanho dos apresentados na figura 19 (seção 4.2), 550 pb para pSL18-ICL, 500 pb para pSL18-MS, 350pb para pSL18-ICLanti e 250pb para pSL18-MSanti. Nas construções duplas testamos dois conjuntos de pares de *primers*, um de cada vez. Ou seja, para Dupla-ICL-MS utilizamos os pares de *primers* para pSL18-ICL e para pSL18-MS, e para Dupla-ICL-MS-anti usamos os pares de iniciadores para pSL18-ICLanti e para pSL18-MSanti. A Figura 26 apresenta quatro géis de agarose mostrando os produtos de PCR de diversos clones que cresceram em paromomicina, com os pares de iniciadores das quatro construções de interesse. Como pode ser observado, nem todos os clones resistentes ao antibiótico apresentaram um resultado positivo em relação à presença dos fragmentos de interesse. Isso significa que os plasmídeos podem ter se fragmentado na hora da integração no genoma ou mesmo antes, e carregaram apenas parte da sequência introduzida na célula. Esse resultado mostra a importância desta etapa de seleção por PCR, selecionando apenas os genes que possuem a parte de interesse do plasmídeo introduzido na célula. Esses clones PCR positivos foram os clones utilizados para as análises fenotípicas.

Figura 26: Géis de agarose 1,2% com o produto de PCR das colônias demonstrando claramente a diferença entre os clones que receberam os plasmídeos (as canaletas de 2 a 11 que apresentaram banda de tamanho esperado) e os que não os receberam. A) MS chlamy; B) ICL chlamy; C) ICL anti; D) MS anti. Em todos os géis a primeira canaleta representa o Ladder 1Kb. Em A, C e D a última canaleta representa o respectivo plasmídeo, revelando uma banda de mesmo tamanho que os clones que consideramos positivos, ou seja, que integraram o plasmídeo em seu genoma. Em B, a última canaleta representa um controle negativo, a alga CC424 sem ter sofrido a transformação. O controle negativo da reação de PCR em A e C estão representados pela canaleta de número 2, já em B e D é a de número 11.

A tabela 11 resume todos os clones que foram obtidos nas transformações.

Tabela 11: Transgênicos conseguidos por confirmação de PCR convencional com cada uma das construções de interesse. Na terceira coluna podemos observar o número de quantos clones positivos foram obtidos.

Construções	Número total de colônias transgênicas	Clones positivos por PCR
pSL18-ICL	>200	37
pSL18-MS	>200	33
Dupla-ICL-MS	>200	8
pSL18-ICLanti	>300	44
pSL18-MSanti	>300	52
pSL18-ICL-MS-anti	>300	24

4.4 **Screening** de transgênicos com alto teor lipídico por marcação com *Nile Red*

O *Nile Red* é um corante lipofílico usado para a detecção e quantificação intracelular de corpos lipídicos em diversos sistemas biológicos. Nesta técnica, a quantidade de luz fluorescente emitida é diretamente proporcional à quantidade de lipídeos neutros presentes, em sua maioria constituídos por lipídeos de estocagem (TAG) (Sitepu *et al.*, 2012). O solvente orgânico DMSO utilizado para a diluição do corante também é um ponto extremamente importante nesta etapa. Ele auxilia no carregamento do corante através da parede celular e das membranas de micro-organismos (neste caso, somente pelas membranas, uma vez que a linhagem não possui parede celular) (Chen *et al.*, 2009). Deste modo, esta técnica foi empregada neste trabalho para que se pudesse realizar um *screening* dos transgênicos que possuísem uma diferença significativa na quantidade de lipídeos neutros em relação à linhagem parental.

Das seis diferentes construções inseridas nas algas (quatro construções únicas e duas duplas), apenas uma delas apresentou aumento significativo na quantidade de lipídeos analisada pela técnica de *Nile Red*. Enquanto as alterações causadas em apenas um dos genes (tanto para super quanto para subexpressão) e a alteração causada para a superexpressão de ambos os genes não apresentaram nenhuma alteração significativa, a construção da linhagem subexpressando os dois genes ao mesmo tempo apresentou quantidade de lipídeo muito superior à linhagem parental. Nestes experimentos iniciais, esta linhagem Dupla-ICL-MS-anti-4, quando crescida em meio TAP mostrou um aumento de 1,5 vezes na quantidade de lipídeos neutros. Quando submetida à escassez de nitrogênio, essa diferença se intensificou ainda mais, sendo a transgênica 3 vezes mais eficiente do que a alga selvagem na estocagem de lipídeos. O resultado desse primeiro *screening* realizado pela técnica *Nile Red* em todas as seis construções, está representado pelos gráficos da Figura 27. Para uma maior segurança dos resultados apresentados, os resultados de *Nile Red* foram realizados em três experimentos diferentes, em dias diferentes e todos apresentaram dados semelhantes.

Subexpressão das Enzimas

Superexpressão das Enzimas

Figura 27: Gráficos baseados nos valores de fluorescência emitidos pelas células marcadas com o *Nile Red*. A maioria das transformações não revelou grande impacto na quantidade de lipídeos neutros em meio TAP (mostrado na figura nas letras A, B, E, F e G), e tampouco em meio TAP sem nitrogênio (dados não mostrados). No entanto, um dos transformantes subexpressando ambas as enzimas Dupla-ICL-MS-anti-4 revelou um impacto significativo tanto em meio (C) TAP, quanto em meio (D) TAP sem nitrogênio. Os dados representam valor médio $\pm$ desvio-padrão e foram analisados com o método ANOVA pelo programa R, com diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos dadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,00$.

Após a seleção da linhagem Dupla-ICL-MS-anti-4, que apresentou uma quantidade de lipídeo significativamente maior do que a linhagem CC424 parental, os experimentos seguintes foram todos conduzidos de forma a comparar características dessa nova linhagem com a linhagem selvagem.

4.5 Confirmação do duplo transgênico de subexpressão

Antes de começar as análises moleculares e fenotípicas da linhagem transgênica com alta capacidade de armazenamento de lipídeos, um novo teste PCR convencional foi realizado de modo a confirmar que a linhagem integrou os plasmídeos inseridos em seu genoma. Um fragmento com um tamanho de aproximadamente 350 pares de base contendo parte da região promotora do plasmídeo e parte da pequena sequência antisense do gene *icl* pode ser visualizado no gel de agarose 1,2% da Figura 28. Da mesma maneira, um fragmento de aproximadamente 250 pares de base contendo a mesma parte da região promotora do plasmídeo e a parte da pequena sequência antisense do gene *ms* também pode ser observada na mesma figura. Com essa confirmação pudemos dar prosseguimento às próximas etapas do trabalho.

Figura 28: Gel de agarose 1.2% mostrando a ausência do plasmídeo pSL18MSanti em CC424 (primeira canaleta) e a presença do mesmo no transgênico (segunda canaleta). Na terceira canaleta está o controle positivo da PCR realizada com DNA plasmidial. As três canaletas seguintes representam os mesmos resultados, porém utilizando-se os *primers* para o fragmento de do plasmídeo pSL18ICLanti. A última canaleta é a Ladder 1kb.

4.6 Análise da expressão gênica de *isocitrato liase* e *malato sintase*

4.6.1 Extração de RNA e digestão do DNA presente

A técnica de PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) foi empregada de forma a comparar a quantidade relativa de transcritos (RNAs mensageiros) entre a linhagem transgênica e a selvagem. Para isso, uma extração de RNA total foi realizada com as algas crescidas em meio TAP e em meio sem nitrogênio. Após a extração do RNA total das algas transgênicas e selvagens, foi realizada uma digestão com DNase para que o DNA que foi extraído junto com o RNA fosse degradado. Isso é importantíssimo, uma vez que o DNA presente nas amostras, mesmo que em quantidades ínfimas, pode ser usado como molde durante o ensaio

de qRT-PCR no lugar do cDNA, nos dando resultados falso-positivos. Na Figura 29A, pode-se ver o gel 1,2% logo após a extração de RNA total com a presença de DNA em todas as amostras. Já no gel da Figura 29B, as mesmas amostras em mesma ordem são visualizadas num gel também 1,2%, porém agora sem nenhuma contaminação por DNA.

Figura 29: Gel de agarose 1.2% comprovando a eficiência da digestão pela enzima DNase. As primeiras 6 canaletas são triplicatas de CC424 seguidas por triplicatas da transgênica CC424-Dupla-ICL-MS-anti crescidas em meio TAP. As canaletas de 7 a 12 são as triplicatas crescidas em meio sem nitrogênio em mesma ordem, primeiro as selvagens e depois as transgênicas. A) Antes do tratamento com DNase; B) Depois da digestão com DNase.

Como o RNA não foi adicionado em mesma quantidade nas canaletas, houve uma clara diferença de concentração em algumas amostras. No entanto, nosso objetivo era confirmar que não havia contaminação por DNA nas amostras.

4.6.2 Verificação da Integridade do RNA por Bioanalyzer

Para confirmar a integridade e qualidade do RNA utilizado para confeccionar o cDNA que será utilizado na técnica de qRT-PCR, foi utilizado o aparelho Bioanalyzer. Este é um equipamento destinado à determinação do tamanho, quantificação e controle de qualidade de ácidos nucleicos (DNA, RNA) que se baseia na técnica microfluídica. Através de uma matriz microfluídica (podemos comparar essa matriz microfluídica grosseiramente a um microgel de agarose), as amostras são individualmente separadas e uma imagem do gel é criada em computador, onde os resultados podem, então, ser analisados.

Como pode ser visualizado na Figura 30, todas as amostras de RNA utilizadas se mostraram íntegras, ou seja, sem um nível de degradação que pudesse interferir na confecção do cDNA e posterior análise por qRT-PCR. O conjunto de amostras do número 7 ao 12, representando as amostras crescidas em meio TAP sem nitrogênio apresentaram uma qualidade um pouco inferior às amostras crescidas em meio TAP (1-6). Isso se deu provavelmente pelo fato de que quando submetidas ao estresse da escassez de nitrogênio, ou qualquer outro estresse celular, as células não se mostram tão saudáveis quanto quando crescidas em condições ideais, podendo apresentar uma morte celular mais rápida. Portanto, no sétimo dia de crescimento, enquanto as amostras crescidas em meio TAP apresentaram um RNA mais íntegro evidenciando uma cultura mais saudável, as

amostras crescidas em meio TAP sem nitrogênio se mostraram um pouco menos saudáveis, com um nível de degradação de RNA pequena, mas evidente.

Figura 30: Confirmação da integridade do RNA que pode ser visualizado na imagem do gel apresentada pelo equipamento Bioanalyzer. As primeiras 6 canaletas são triplicatas de CC424 seguidas por triplicatas da transgênica Dupla-ICL-MS-anti-4 crescidas em meio TAP. As canaletas 7 a 12 são triplicatas de CC424 seguidas por triplicatas da transgênica crescidas em meio sem nitrogênio.

4.6.3 Produção de cDNA e RT-PCR

A partir do RNA total que foi checado quanto à presença de DNA e sua integridade, o cDNA que será utilizado no ensaio de qRT-PCR foi confeccionado. Utilizando o kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System*, foi adicionado ao RNA total sequências de oligo (dT), essas sequências se ligam às caudas poliA dos mRNAs de maneira aleatória. Depois disso é adicionada uma enzima transcriptase reversa, a qual sintetiza a fita de DNA a partir dos molde de mRNA utilizados. Após esta etapa é adicionada uma RNase, que é responsável por degradar a fita molde de mRNA que ainda se encontra pareada à nova fita de cDNA confeccionada. Desta

maneira, ao final deste ensaio, teremos uma mistura de todos os transcritos que estavam presentes na célula em determinado momento, em forma de cDNA.

Com o intuito de se testar a presença desse cDNA produzido, os *primers* desenhados para o ensaio de PCR em tempo real foram utilizados em um ensaio de PCR convencional. Os cDNAs confeccionados foram utilizados como *templates* para este experimento. Os três pares de *primers* apresentados na seção 4.10.3 (sendo um para actina-representando um controle interno, um para *icl* e um para *ms*), foram utilizados separadamente nas reações de PCR e cada uma das 12 amostras de cDNA foi testada. Os produtos da RT-PCR foram aplicados em gel de agarose 1,2% demonstrando que em todas as amostras o cDNA presente foi amplificado para os três pares de *primers* (Fig 31). Em todos eles o tamanho do fragmento correspondeu ao esperado, uma vez que os *primers* foram confeccionados para o ensaio de PCR em tempo real quantitativo, produzindo fragmentos pequenos (de 100 a 300 pares de bases).

Figura 31: Gel de agarose 1,2% mostrando a presença de cDNA pelo anelamento dos primers confeccionados para o ensaio de PCR em tempo real quantitativo. As primeiras 6 canaletas são triplicatas de CC424 seguidas por triplicatas da transgênica Dupla-ICL-MS-anti-4 crescidas em meio TAP. As canaletas são triplicatas de CC424 seguidas por triplicatas da transgênica Dupla crescidas em meio sem nitrogênio. A) *Primers* para Actina. B) *Primers* para ICL. C) *Primers* para *ms*.

Como o experimento foi realizado sem padronizar a quantidade de cDNA em todas as amostras, houve diferença de amplificação em algumas amostras. No entanto, nosso objetivo era apenas confirmar a síntese do cDNA.

4.6.4 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

Neste trabalho a técnica de qRT-PCR foi empregada com a finalidade de comparar a diferença do nível de expressão gênica dos genes *icl* e *ms* entre as linhagens selvagem e transgênica. Para isso foram construídos pares de *primers* específicos para cada um dos genes, além de um par de *primer* para o gene da actina (as sequências desses *primers* encontram-se descritas na seção 4.10.3). Estes *primers* foram testados em uma curva com quatro concentrações de cDNA e seu comportamento foi satisfatório para sua utilização nos ensaios (dados não mostrados). O controle interno foi realizado utilizando-se o gene da actina.

Ambos os genes se mostraram subexpressos nos transgênicos em comparação à linhagem selvagem. Ambos os genes apresentaram uma diminuição de aproximadamente três vezes em sua expressão. Esses resultados estão representados pelos gráficos da figura 32, dados após análise realizada no próprio *software* do equipamento *StepOne™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). Estes resultados só foram realizados para as triplicatas de selvagem e transgênica que foram cultivadas em meio sem nitrogênio (canaletas 7 a 12 da Figura 30).

Figura 32: Níveis de expressão gênica detectados no ensaio de PCR em tempo real comparativo ($\Delta\Delta CT$). Essa análise mostra que tanto *ms* (A) quanto *icl* (B) tiveram seus níveis de expressão bastante diminuídos em relação ao controle. Os dados representam valor realtivo, considerando-se o valor da linhagem selvagem CC424 igual a 1. Os resultados foram analisados com o método ANOVA pelo programa R, com diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos dadas por *** $p < 0,00$.

4.7 Comparação da produção de biomassa entre as linhagens transgênica e selvagem

Foi verificado se a mutação introduzida causou danos na produção de biomassa da alga transgênica. Para isso, curvas de crescimento em meio TAP e em meio TAP sem nitrogênio foram realizadas ao longo de 7 dias. Como podemos visualizar na Figura 33 representada pelos gráficos, não houve nenhum impacto significativo na produção de biomassa na alga transgênica. Em meio contendo nitrogênio, o crescimento de ambas as linhagens (selvagem e transgênica) foi mais lento, porém entre elas também não houve alterações significativas.

Figura 33: Curvas de crescimento das linhagens transgênica e selvagem em meio (A) TAP, (B) TAP com escassez de nitrogênio.

4.8 Quantificação e qualificação de ácidos graxos pela técnica de CG-EM

A análise do perfil e da quantificação de ácidos graxos foi realizada pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas (CG-EM). Na saída da coluna, o espectrômetro de massas fragmenta e ioniza os ácidos graxos, que podem ser identificados por uma biblioteca presente no equipamento. De acordo com a comparação das áreas dos picos formados pelas amostras no momento de detecção e as áreas dos picos de um padrão de composição e concentração conhecidas, também é possível quantificar essas amostras. Além do fato de que um padrão também confirma a análise realizada por comparação na biblioteca do espectrômetro de massas.

Como descrito no materiais e métodos, as algas foram coletadas ao sétimo dia de crescimento e posteriormente liofilizadas. Foi realizada extração e derivatização dos ácidos graxos presentes. Estas amostras foram então injetadas no equipamento de CG-EM e os seguintes ácidos graxos foram detectados e quantificados nas algas selvagem e na transgênica CC424-Dupla-ICL-MS-anti (Figura 34):

Figura 34: Quantificação de ácidos graxos representados no cromatograma gerado pelo CG/EM. Os ácidos graxos nomeados, pela biblioteca do CG/EM, são aqueles encontrados em maior quantidade em *C. reinhardtii*, com exceção do ácido tridecanóico (C13), que foi adicionado como padrão interno. Os dados representam valor médio $\pm$ desvio-padrão e foram analisados com o método ANOVA pelo programa R, com diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos dadas por *** $p < 0,00$.

Analisando individualmente cada ácido graxo, os resultados obtidos foram resumidos na tabela a seguir:

Tabela 12: Quantificação e perfil de ácidos graxos da alga selvagem CC424 e da transgênica Dupla-ICL-MS-anti. A última coluna representa a porcentagem que a alga transgênica apresentou a mais do que a selvagem.

Ácido graxo	Quantidade total (µg) Transgênica	Quantidade total (µg) Selvagem	% de diferença entre Transgênica e Selvagem (Mut/Selv)
C13	40	40	0%
C14	0,51	0,24	111%
C16	78,42	45,06	74%
C16:1	1,93	1,67	15%
C18:0	9,30	3,91	137%
C18:1 cis 9	30,74	18,93	62%
C18:1 cis 11	20,27	8,5	138%
C18:2	61,68	24,67	150%
C18:3	80,67	39,03	106%
C20:0	0,49	0,11	311%
C20:1	0,84	0,38	119%
C20:2	0,27	0,07	253%
C20:3	0,16	0,06	167%
C22:0	0,11	0,02	292%
C24:0	0,08	0,02	204%
Total	285,53	142,73	100%

Através dos resultados do perfil e quantidade de ácidos graxos gerados no CG-EM, foi possível observar que, não somente quantidade total de ácidos graxos foi maior na alga transgênica em relação à selvagem, como também praticamente todos os ácidos graxos analisados de maneira individual. Dos 14 ácidos graxos analisados, apenas C16:1 não apresentou diferença significativa entre as linhagens transgênica e selvagem. Todos os outros apresentaram maior quantidade na linhagem transgênica Dupla-ICL-MS-anti-4.

4.9 Quantificação das proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais e clorofila a

É interessante analisar se a mutação que está se mostrando responsável pelo aumento de lipídeos na célula, pode estar causando algum impacto deletério na produção de outras moléculas importantes para a sobrevivência celular. Por esse motivo, a quantificação de proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais e clorofila a foi realizada. Nos três casos a quantidade não apresentou alterações significativas quando comparamos a linhagem transgênica com a selvagem (Figura 35).

Figura 35: Variação de (A) Clorofila a, (B) proteínas solúveis totais e (C) carboidratos solúveis totais entre a linhagem selvagem CC424 e a linhagem transgênica Dupla-ICL-MS-anti. O eixo vertical apresenta um valor relativo, considerando-se o valor da linhagem selvagem CC424 igual a 1.

5. DISCUSSÃO

Com a necessidade da introdução de novas fontes de energia na matriz energética mundial e todas as vantagens apresentadas pelas microalgas, estes organismos vêm se tornando uma alternativa cada vez mais viável. Hoje, o biodiesel proveniente desses organismos já está sendo comercializado em diversas partes do mundo sendo misturado a uma porcentagem de 20% ao diesel de petróleo (Schmidt, 2007). Por esse motivo, estes organismos tem se tornado alvo de pesquisadores do mundo todo para a produção de biodiesel proveniente de alga (Radakovits *et al.*, 2010). As pesquisas são voltadas, principalmente, para a otimização do cultivo e da produção de lipídeos por esses organismos. Diversos trabalhos com este objetivo já foram realizados e resultados bastante animadores já foram alcançados (Courchesne *et al.*, 2009).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal, utilizando a engenharia genética e a engenharia bioquímica, a produção de novas linhagens transgênicas da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* com uma capacidade aumentada de produção de lipídeos sem que houvesse perda de biomassa e outros impactos deletérios na célula. Esta espécie de microalga foi selecionada para este trabalho por ser um organismo modelo, além de possuir o genoma sequenciado, o que é uma grande vantagem no que diz respeito à manipulação genética de organismos. Além disso, esta espécie já foi alvo de diversos trabalhos que tiveram como objetivo a manipulação genética voltada para o aumento de lipídeos.

Antes de se partir para os experimentos de manipulação metabólica, foi indispensável que se fizesse uma primeira curva de crescimento da linhagem CC424 da microalga *C. reinhardtii*, de modo a avaliar se o organismo estava se comportando de maneira condizente à literatura. Já nas primeiras curvas de

crescimento, a microalga apresentou resultados bastante semelhantes aos encontrados pelos grupos de Van e Spalding (1999) e Kasai e colaboradores (2002), entrando em fase exponencial no dia 2 e em fase estacionária no dia 5. Isso provavelmente se deu pelo fato de *C. reinhardtii* ser uma microalga modelo e altamente cultivada em laboratórios de pesquisa por muitas décadas. Por estes motivos, a reprodutibilidade de experimentos com essa espécie, em especial em experimentos básicos como curva de crescimento, é extremamente alta. Além disso, estes primeiros dados nos garantiram que os experimentos seguintes poderiam ser realizados de maneira segura, ou seja, sem o receio de se estar trabalhando com uma cultura que se comporta de maneira contraditória aos dados da literatura.

Diversas são as estratégias utilizadas para a modificação genética de microalgas para aumento de lipídeos. Essas estratégias vão desde a manipulação de vias indiretas, que levam a impactos no metabolismo de lipídeos, até a modificação da via propriamente dita. Entre os meios indiretos, podemos citar (a) a diminuição dos complexos antena, aumentando a eficiência fotossintética em altas concentrações de luz (Polle *et al.*, 2000) ou (b) o silenciamento das vias de armazenamento de compostos de estocagem alternativos, como o amido, direcionando todo o acúmulo de energia para a formação de lipídeo (Ball, 2002). Já os meios diretos, podemos citar (a) a manipulação de genes do próprio metabolismo de lipídeos que levam a um aumento na sua produção (Jain *et al.*, 2000) ou (b) o silenciamento de enzimas que estão relacionadas à degradação desses compostos (Molnar *et al.*, 2009)

Neste trabalho, a estratégia utilizada para o aumento de lipídeos foi indireta. Após um extenso estudo na literatura, as enzimas da via do glioxilato foram selecionadas para a manipulação genética e posterior caracterização dos impactos

causados pelas mutações. Para isso, o plasmídeo pSL18 contendo um promotor constitutivo forte foi utilizado para a clonagem dos fragmentos de interesse e posterior transformação genética nas algas. Seis tipos de linhagens transgênicas diferentes foram criadas, duas delas superexpressando os genes da via do glioxilato separadamente, duas delas subexpressando esses genes, e duas linhagens duplas transgênicas, ou seja, uma delas superexpressava as duas enzimas ao mesmo tempo e a outra subexpressava as duas enzimas ao mesmo tempo. Como estratégia de superexpressão, a sequência de cada um dos genes endógenos foi clonada após o promotor constitutivo forte PsaD, de forma a causar uma expressão gênica maior nessas linhagens. Já para a subexpressão dos genes, a estratégia de RNAi foi utilizada.

A técnica de RNAi é uma das técnicas mais bem caracterizadas e amplamente utilizada atualmente para diminuição da expressão gênica. A interferência mediada por RNA é um fenômeno que ocorre naturalmente nos organismos eucariotos e se mostra exercendo um papel primordial na eliminação de mRNAs anômalos e na defesa do organismo contra parasitas moleculares (Sun e Tsao, 2008). O processo de interferência por RNA foi descrito pela primeira vez em plantas no início da década de 90. Na mesma época, em 1993, Guo e colaboradores descreveram os miRNAs como uma regulação endógena em *Caenorhabditis elegans*. Mas foi em 1998 que a técnica foi mais bem caracterizada, quando Andrew Fire e Craig Mello observaram que moléculas de fita dupla de RNA (*double strand RNA* – dsRNA) eram efetivamente capazes de causar a supressão de expressão de um determinado gene. Hoje sabemos bastante a respeito do mecanismo como estes RNAs de interferência agem na célula e a maneira como os mRNAs são enviados para a degradação em cada caso específico. Depois de inúmeros experimentos de

sucesso realizados com esta técnica e da elucidação de muitos dos passos de seu mecanismo de ação, esta se tornou uma ferramenta cada vez mais explorada pelos cientistas. Hoje, diversos trabalhos vêm utilizando essa técnica nas mais diversas áreas de pesquisa, como terapia gênica, caracterização de genes ou até mesmo o efeito que uma queda de expressão pode ter sobre uma via importante do metabolismo (Guo *et al.*, 2012). Neste contexto utilizamos essa abordagem como estratégia para diminuir a expressão dos genes da via do glioxilato, *isocitrato liase* e *malato sintase*, a fim de analisar que efeitos sobre o metabolismo de lipídeo essa subexpressão poderia causar.

Dentre todas as linhagens analisadas, a única que apresentou quantidade de lipídeo aumentada em relação a selvagem foi a linhagem que subexpressava ambas as enzimas do ciclo, Dupla-ICL-MS-anti-4. Neste momento foi realizada a confirmação de estabilidade da mutação inserida, mostrando que essas mutações se mantiveram por inúmeras passagens das células. Essa é mais uma característica vantajosa dessa espécie, a estabilidade das mutações realizadas duram por muitos meses (Meslet-Cladiere e Vallon, 2011). Dessa maneira foi possível dar prosseguimento às próximas etapas do trabalho.

Antes de se começar os experimentos comparativos entre a nova linhagem transgênica e a selvagem de forma a avaliar o impacto em outras características fenotípicas das algas causadas pela mutação introduzida, foi necessária a confirmação de que a mutação estava efetivamente causando a diminuição da expressão gênica de *icl* e *ms*. Isso é importante uma vez que as integrações genômicas em *C. reinhardtii* ocorrem de maneira aleatória. Isso significa que muitas vezes há a integração da sequência inserida, mas ela pode não estar sendo

transcrita, já que existem regiões no DNA que não são acessíveis à maquinaria de transcrição.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real é uma técnica desenvolvida através do refinamento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) convencional (Saiki *et al.*, 1985). Esta técnica tem sido um método padrão para mensurar e verificar mudanças na expressão gênica através da quantidade de mRNA, ou cDNA proveniente deste (Ong e Irvine, 2002). Dentre suas utilizações típicas estão a detecção de patógenos (Machya, 2004), aberrações cromossômicas (Mattarucchi *et al.*, 2005), além da clássica análise de expressão gênica (Levsky *et al.*, 2002), entre outros usos.

No presente trabalho, esta técnica foi utilizada com o intuito nos certificar de que estamos trabalhando com uma linhagem transgênica que, além de ter integrado a sequência do plasmídeo, está apresentando as alterações esperadas na expressão dos genes do ciclo do glioxilato. A estratégia de RNAi e a integração das mutações no genoma da alga se mostraram muito eficientes, indicando uma diminuição da expressão de ambos os genes alvo, *isocitrato liase* e *malato sintase*. Essa diferença foi de aproximadamente 3 vezes em ambos os genes cultivados em meio sem nitrogênio. A partir desse resultado foi interessante comparar também outras características fenotípicas entre as linhagens transgênica e selvagem, para que pudessemos chegar a conclusões mais claras sobre o efeito da mutação sobre a alga.

Os experimentos de CG-EM serviram para confirmar os dados de *Nile Red* em relação à concentração de ácidos graxos totais, além de delimitar o perfil e as concentrações de cada um em específico. Analisando apenas esta classe de lipídeos, a alga transgênica apresentou uma concentração total 100% maior do que

a alga selvagem, mostrando impacto significativo na quantidade desses lipídeos de estocagem. Os ácidos graxos que mais variaram em relação a sua concentração foram C20:00 (311%), C20:2 (253%) e C22:0 (292%), porém estes ácidos graxos estão presentes em quantidades absolutas muito pequenas, não sendo um impacto significativo quando se visa a produção de biocombustível. Para um biocombustível de qualidade os ácidos graxos mais importantes são os C16 e os C18, em uma mistura que proporcione ao óleo as características físicas para que o biodiesel se enquadre nas normas da ANP. Dentre estes ácidos graxos, o C16:0 aumentou 74% na linhagem transgênica, sendo uma característica importante, pois ele é precursor de todos os outros de cadeia maior. Todos os C:18 (C18:0, C18:1(9), C18:1(11), C18:2 e C18:3), que são os ácidos graxos em maior quantidade absoluta nas células, se mostraram com uma concentração bem elevada em relação a alga selvagem, sendo todos estes ácidos graxos importantes na composição de um biodiesel de qualidade.

Quanto ao crescimento, a alga transgênica CC424-Dupla-ICL-MS-anti-4 não apresentou perda de biomassa quando comparada à linhagem selvagem. É muito comum em experimentos que visam um aumento na concentração de lipídeos, que esse aumento venha acompanhado de uma diminuição significativa de biomassa (Ratledge e Wynn, 2002). Como a alta produção de biomassa é um fator tão importante como a quantidade de lipídeo no que diz respeito à produção de biocombustível, essas mutações se tornam inviáveis de serem empregadas, a não ser que o problema seja contornado de alguma maneira. Dessa maneira, a mutação inserida por nós não apresentou nenhuma restrição quanto a possíveis impactos no crescimento da alga.

Quando trabalhamos com sistemas complexos, como é o caso de um organismo vivo, toda e qualquer alteração realizada pode resultar em consequências não previstas. Por isso, é interessante, quando se introduz uma mutação em um organismo, que sejam avaliados outros possíveis impactos em outros compostos essenciais para a sobrevivência da célula. Muitas vezes a característica desejada é expressa no organismo transgênico, porém seus efeitos podem agir de maneira deletéria em outras vias do metabolismo (Ratledge e Wynn, 2002). Neste contexto as concentrações de proteínas solúveis totais, clorofila a e carboidratos solúveis totais foram comparadas entre a linhagem selvagem CC424 e a linhagem transgênica Dupla-ICL-MS-anti-4.

As proteínas são os compostos orgânicos mais abundantes da célula, representando grande parte de seu peso seco. São encontradas em todas as partes da célula e fundamentais sob todos os aspectos de sua estrutura e função (Cooper, 2000). Por sua vez, a clorofila a é um pigmento essencial para a ocorrência do processo de fotossíntese, sendo responsáveis pela absorção da luz nos cloroplastos (Miyashita *et al.*, 1997). Qualquer alteração deletéria em um desses dois compostos seria um problema para a célula uma vez que ambos são indispensáveis para a sobrevivência celular. Em nenhum dos casos a alga transgênica apresentou alteração significativa em relação à alga selvagem, ou seja, as quantidades de proteínas totais e clorofila a se mostraram semelhantes nas duas linhagens. Estes resultados foram de extrema importância pois, juntamente ao fato de não ter havido perda de biomassa na linhagem transgênica, isso nos mostra que nenhum efeito deletério foi causado nesses componentes celulares essenciais.

Os carboidratos solúveis totais representam, em sua maioria, uma forma de compostos de estocagem de energia para a célula de origem não lipídica (Cooper,

2000). Existem diversos trabalhos na literatura onde a estratégia empregada para o aumento de lipídeo é exatamente a inibição dessa via de estocagem e o redirecionamento desse estoque para a via de lipídeos. No entanto, neste trabalho, apesar da quantidade de lipídeo estar aumentando, os dados não mostraram nenhuma diminuição na quantidade de carboidratos solúveis totais. Isso elimina a possibilidade de a quantidade de lipídeo estar aumentando devido a um redirecionamento de energia da via de carboidratos. Isso sugere que esse aumento pode estar sendo proveniente (1) de uma maior absorção de energia, ou (2) do acúmulo de uma energia que não está sendo degradada. Como a via do glioxilato é altamente relacionada à degradação de lipídeos, acreditamos que a segunda opção é a mais plausível.

A via do glioxilato é uma via que está relacionada à degradação de lipídeos em momentos em que a célula precisa de energia (Eastmond e Grahan, 2001) e utilização de compostos alternativos (como o acetato, por exemplo) como fonte de energia para a célula (Kornberg, 1965). Em condições de estresse (como a escassez de nutrientes) em que as células apresentam grande quantidade de lipídeos, os genes exclusivos dessa via apresentam sua expressão aumentada (Nguyen *et al.*, 2008; Toepel *et al.*, 2011). Neste trabalho, com a subexpressão dos genes *isocitrato liase* e *malato sintase*, houve um acúmulo de lipídeo de 1,5 vezes em meio de cultura normal, e de até 3 vezes em meio de cultura sob escassez de nitrogênio. Estes resultados vêm acompanhados de uma diminuição proporcional da quantidade de transcritos em cultivos sem nitrogênio (3x), e da ausência de efeitos deletérios na produção de outros compostos analisados. Isso sugere fortemente que a subexpressão dessas enzimas foi o fato que resultou no aumento na quantidade de lipídeos neutros na linhagem CC424-Dupla-ICL-MS-anti-4 transgênica da espécie

de microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Resultados semelhantes a este, referentes à subexpressão desse ciclo, já foram descritos na literatura, corroborando a nossa hipótese (Plancke *et al.*, 2013; Graham, 2008).

6. CONCLUSÕES

As transformações genéticas pelo método de agitação com microesferas de vidro se mostrou eficiente e reprodutível em nosso laboratório. Essa foi uma importante aquisição para nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas, uma vez que pesquisas em biologia molecular de qualidade já vêm sendo realizadas por décadas, porém nunca antes havia se empregado uma técnica de engenharia genética. Com o domínio desta nova abordagem, ficará mais fácil caracterizar genes e adquirir conhecimento sobre as vias bioquímicas estudadas. Também se torna possível a manipulação de genes voltados para a produção de compostos de interesse, uma vez que nosso laboratório trabalha com diversas linhas de pesquisa voltadas para a descoberta e aplicação de novos produtos para as mais diversas áreas da indústria.

Uma nova linhagem transgênica da espécie de microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, chamada por nós de CC424-Dupla-ICL-MS-anti-4, subexpressando os dois genes-chave do ciclo do glioxilato (*isocitrato liase* e *malato sintase*) foi capaz de produzir 1,5 vezes mais lipídeos neutros do que a linhagem transgênica em condições normais e 3 vezes mais em condições de privação de nitrogênio. Esta quantidade é diretamente relacionada à diminuição dos níveis de expressão gênica da mesma linhagem transgênica sob condições de escassez de nitrogênio, 3 vezes menos transcritos de ambos os genes quando comparada à alga selvagem CC424. Esses resultados tornam os genes *isocitrato liase* e *malato sintase* promissores no que diz respeito à manipulação genética de algas para aumento de lipídeo. Seria interessante utilizar os resultados e o conhecimento obtidos neste trabalho para transformar geneticamente linhagens de microalgas que já estão sendo utilizadas

comercialmente para a produção de biodiesel. Dessa forma, a eficiência de produção seria certamente aumentada.

A produção de biomassa, a quantidade de proteínas solúveis totais, clorofila a e carboidratos solúveis totais, não foram alterados de maneira significativa pela mutação. Isso sugere que a subexpressão dos genes do ciclo do glioxilato não causa nenhum efeito deletério na célula, não se mostrando essenciais para sua sobrevivência em condições autotróficas.

A linhagem transgênica CC424-Dupla-ICL-MS-anti-4 apresentou aumento significativo em quase todos os 14 ácidos graxos detectados, com a exceção do C16:1, que não apresentou diferença significativa. Dentre estes ácidos graxos que aumentaram sua concentração, estão todos os C16 e todos os C18. Enquanto os C:16 são precursores de todos os outros de cadeia maior, os C18 são os principais componentes de um biodiesel de qualidade, proporcionando viscosidade e estabilidade apropriadas para que o biocombustível se adeque aos padrões estabelecidos pela ANP.

Pela primeira vez no Brasil, um grupo de pesquisa conseguiu modificar geneticamente uma espécie de microalga com o intuito de produzir biocombustível. Este foi um enorme ganho para nosso país, uma vez que este assunto esta sendo abordado nas mais diversas partes do mundo. Ainda, Este trabalho abre portas para que outros grupos brasileiros realizem pesquisas nessa área.

7. REFERÊNCIAS

- _____. Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=60467&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1400164596326>
> Acesso em 20/04/2014.
- _____. Chamycenter. Disponível em: <http://chlamycollection.org/> Acesso em 20/04/2014.
- _____. Esquema da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Disponível em: www.microbe.com
Acesso em 01/04/14).
- _____. Esquema da interação entre as moléculas do ciclo do glioxilato, ciclo de Krebs e a gliconeogênese. Disponível em: <http://www.biologyexams4u.com/2012/04/glyoxysomes.html>
Acesso em 01/04/14.
- _____. Evolução dos biocombustíveis no Brasil. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=60467&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1400209948850>
Acesso em 01/04/14.
- _____. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2013. Biofuels and the sustainability challenge: A global assessment of sustainability issues, trends and policies for biofuels and related feedstocks. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/017/i3126e/i3126e.pdf> Acesso em 31/03/14.
- _____. GenBank (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Acesso em 20/04/2014.
- _____. IEA (2004), World Energy Outlook, IEA/OECD, Paris. Disponível em: <http://www.worldenergyoutlook.org/media/weowebiste/2008-1994/weo2004.pdf>
Acesso em 31/03/14.
- _____. IEA (2008a), Energy Technology Perspectives 2008, IEA/OECD, Paris. Disponível em: <http://www.worldenergyoutlook.org/media/weowebiste/2008-1994/WEO2008.pdf>
Acesso em 31/03/14.
- _____. Matriz energética brasileira para combustíveis veiculares. 2008. Disponível em: <http://www.mda.gov.br/> Acesso em 20/04/2014.
- _____. OPEC states declare oil embargo. Disponível em: <http://www.history.com/this-day-in-history/opec-states-declare-oil-embargo> > Acesso em 20/04/2014.
- _____. O Selo Combustível. Disponível em: <http://portal.mda.gov.br/portal/saf/programas/biodiesel/2286313>
> Acesso em 01/04/14.

_____. Oscilação do preço do petróleo (óleo bruto), por interferência de questões políticas dos países com maior influência e com as reservas mais expressivas. Disponível em: <<http://www.wtrg.com/prices.htm>> Acesso em 31/03/14.

_____. Principais matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil (Janeiro/2010 a Março/2011). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=472>> Acesso em 01/04/14.

_____. Produção de soja no Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>> Acesso em 20/04/2014.

_____. Reverse Complement. Disponível em: <http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html> Acesso em 20/04/2014.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

APT, K. E.; BEHRENS P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **Journal of Phycology**, v. 35, n. 2, p. 215-226, 1999.

APT, K. E.; GROSSMAN A. R.; KROTH-PANCIC, P. G. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Molecular and General Genetics**, v. 252, p. 572-579, 1996.

ARESTA, M. *et al.* Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction. **Environmental Chemistry Letters**, v. 3, p.136-139, 2005.

ARANDA, D.A.G. *et al.* The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions. **Journal Physical Organic Chemistry**, London, v.22, n.7, p.709-716, 2009.

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

ATHENSTAEDT, K.; G. DAUM. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, n. 1, p. 1-16, 1999.

BALL, S. G. The intricate pathway of starch biosynthesis and degradation in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 55, p. 49-59, 2002.

BHATTACHARYA D. *et al.* Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. **Nature communications**, v. 4, p. 1941, 2013.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5th ed. New York: W H Freeman, 2002.

BLABY, I. K. *et al.* Systems-Level Analysis of Nitrogen Starvation-Induced Modifications of Carbon Metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* Starchless Mutant. **The Plant Cell**, v. 25, n. 11, p. 4305-4323, 2013.

BLANC, G. *et al.* The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. **Genome Biology**, v. 13, n. 5, p.39, 2012.

BLANC, G. *et al.* The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. **Plant Cell**, v. 22, n. 9, p. 2943-2955, 2010.

BOOCOCK, D. G. B.; ZHOU, W.; KONAR, S. K. Ethyl esters from single-phase base-catalyzes ethanolysis of vegetable oils. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 80, p. 367, 2003.

BOUDGHENE, A. S.; TRAVERSA, E. Solid oxide fuel cells (SOFCs): a review of an environmentally clean and efficient source of energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 6, p. 433–455, 2002.

BOUVIER-NAVE, P. *et al.* Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 1, p. 85–96, 2000.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 248-254, 1976.

CADORET, J. P. *et al.* Producing recombinant commercial proteins. **M S-Medecine Sciences**, v. 24, n. 4, p. 375-382, 2008.

CAO, Z. *et al.* Engineering the acetyl-CoA transportation system of *Candida tropicalis* enhances the production of dicarboxylic acid. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 1, p. 68–74, 2006.

CARDOZO, K. H. M. *et al.* Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007.

COLLÉN J. *et al.* Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 13, p. 5247-5252, 2013.

CHENEY, D.; METZ, B.; STILLER, J. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in the macroscopic marine red alga *Porphyra yezoensis*. **Journal of Phycology**, v. 37, p. 11, 2001. Supplement.

CHEN, J.Q. *et al.* Antisense PEP gene regulates to ratio of protein and lipid content in *Brassica napus* seeds. **Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 316–320, 1999.

CHEN, W. *et al.* A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, p. 41–47, 2009.

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

CHOW, K. C.; W. L. TUNG. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 778–780, 1999.

COCK J. M. *et al.* The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. **Nature**, v. 465, n. 7298, p. 617–621, 2010.

COLEMAN, R. A.; LEE, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 134-176, 2004.

COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.

COURCHESNE, N. M. D. *et al.* Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 141, n. 1-2, p. 31-41, 2009.

CURTIS, B. A. *et al.* Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. **Nature**, v. 492, n. 7427, p. 59-65, 2012.

DAVIS, M. S. *et al.* Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28593-28598, 2000.

DE CAMBIAIRE, J. C. *et al.* The complete chloroplast genome sequence of the chlorophycean green alga *Scenedesmus obliquus* reveals a compact gene organization and a biased distribution of genes on the two DNA strands. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, p. 37, 2006.

DEHESH, K. How can we genetically engineer oilseed crops to produce high levels of medium-chain fatty acids? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, n. 10, p. 688-697, 2001.

DERELLE E. *et al.* Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p. 11647-11652, 2006.

DELALIBERA, H.C. **Utilização de óleo de girassol como biocombustível em unidade de potencia monocilindro ciclo diesel**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUNAHAY, T. G. *et al.* Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. **Applied Biochemistry and Biotechnology—Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 57–58, p. 223–231, 1996.

DUNAHAY, T. G.; JARVIS, E. E.; ROESSLER, P. G. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *Journal of Phycology*, v. 31, p. 1004–1012, 1995.

DUNAHAY, T. G. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. **Biotechniques**, v. 15, p. 452–460, 1993.

EASTMOND, P. J.; GRAHAM, A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. **TRENDS in Plant Science**. v. 6, p. 72-77, 2001.

EL-SHEEKH, M. M. Stable transformation of the intact cells of *Chlorella kessleri* with high velocity microprojectiles. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 209–216, 1999.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. Balanço Energético Nacional, ano base 2012. Rio de Janeiro, 2013.

EPSTEIN, P.R.; SELBER, J. **Oil: A Life Cycle Analysis of Its Health and Environmental Impacts**. Boston: Center for Health Global Environment. Harvard Medical School, 2002.

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

FUJIWARA, T. *et al.* Periodic gene expression patterns during the highly synchronized cell nucleus and organelle division cycles in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. **DNA Research**, v. 16, n. 1, p. 59-72, 2009.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 405, 2001.

GIEG, L. M.; SUFLITA, J. M. Metabolic indicators of anaerobic hydrocarbon biodegradation in petroleum-laden environments. In: OLLIVIER, B.; MARGOT, M. **Petroleum Microbiology**. 1st ed. Washington: ASM Press, 2005. p. 337-356.

GOBLER CJ, *et al.* Niche of harmful alga *Aureococcus anophagefferens* revealed through ecogenomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 11, p. 4352-4357, 2011.

GRAHAM I.A. Seed Storage Oil Mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 115-142, 2008.

GUO, P. *et al.* Uniqueness, advantages, challenges, solutions, and perspectives in therapeutics applying RNA nanotechnology. **Nucleic Acid Therapeutics**. v. 22, p. 226–245, 2012.

HAERTEL, P. L. **Desenvolvimento de um novo processo para a produção de biodiesel etílico de mamona**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

HARRIS, E. H. *Chlamydomonas* as a Model Organism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 363-406, 2001.

HUBBERT, M. K. Nuclear energy and the fossil fuels. In: **American Petroleum Institute Drilling and Production Practice Proceedings**. 1956. Mar 7–9, San Antonio, Texas. Disponível em: <http://www.hubbertpeak.com/hubbert/1956/1956.pdf> , acesso em 20/04/2014.

HILDEBRAND, M. Prospects of manipulating diatom silica nanostructure. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 146-157, 2005.

ILLMAN, A. M. *et al.* Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 631-635, 2000.

JAKO, C. *et al.* Seed-specific over-expression of an arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 861–874, 2001.

JAIN, R. K. *et al.* Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 959–960, 2000.

KARSTEN, U. *et al.* Low molecular weight carbohydrate patterns in the *Bangiophyceae* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 35, pp. 967-976, 1999.

KASAI, K. *et al.* A RelA-SpoT homolog (Cr-RSH) identified in *Chlamydomonas reinhardtii* generates stringent factor in vivo and localizes to chloroplasts in vitro. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 22, p. 4985-4992, 2002.

KAWATA, M. *et al.* Isolation and characterization of a green alga *Neochloris* sp. for CO₂ fixation. **Advances in Chemical Conversions for Mitigating Carbon Dioxide**, v. 114, p. 637-640, 1998.

KLAUS, D. *et al.* Increased fatty acid production in potato by engineering of acetyl-CoA carboxylase. **Planta**, v. 219, n. 3, p. 389–396, 2004.

KNOTHE, G. Analysis of oxidized biodiesel by ¹H-NMR and effect of contact area with air. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 493-500, 2006.

KIM, S. A.; COPELAND L. Acetyl coenzyme A acetyltransferase of *Rhizobium* sp. (Cicer) strain CC 1192. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3432-3437, 1997.

KINDLE, K. L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 1228–1232, 1990.

King, N. *et al.* The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. **Nature**, v. 451, n. 7180, p. 783-788, 2008.

KORNBERG, H.L. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 99, n. 1, p. 1-11, 1965.

KUMAR, S. V. *et al.* Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 166, p. 731–738, 2004.

LANE, C. E. *et al.* Nucleomorph genome of *Hemiselmis andersenii* reveals complete intron loss and compaction as a driver of protein structure and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19908-19913, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 2th ed. New York: Worth, 1993.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos**, v. 78, p. 15, 2007.

LENZ, D. E. *et al.* Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review. **Toxicology**, v. 233, p. 31-39, 2007.

LEVSKY, J.M. *et al.* Single-cell gene expression profiling. **Science**, v. 297, p. 836–840, 2002.

LIN, H. *et al.* Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 870–874, 2006.

LINDAHL, M.; YANG, D. H.; ANDERSSON, B. Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. **European Journal of Biochemistry**, v. 231, p. 503-509, 1995.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LI, S. J.; CRONAN, J. E. Growth-Rate Regulation of *Escherichia-Coli* Acetyl Coenzyme-a Carboxylase, Which Catalyzes the 1st Committed Step of Lipid Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 2, p. 332-340, 1993.

LI, H. K. *et al.* Effect of nitrogen content on the microstructure and properties of CNx films deposited by pulsed bias arc ion plating. **Acta Metallurgica Sinica**, v. 44, n. 8, p. 917-921, 2008b.

LI, Y. *et al.* *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. **Metabolic Engineering**, v. 12, n. 4, p. 387-391, 2010.

LUQUE, R. *et al.* Biofuels: a technological perspective. **Energy and Environmental Science**, v. 1, n. 5, p. 542–564, 2008.

- MACKYA, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 10, p. 190–212, 2004.
- MARUYAMA, M. *et al.* Introduction of foreign DNA into *Chlorella saccharophila* by electroporation. **Biotechnology Techniques**, v. 8, p. 821–826, 1994.
- MATSUZAKI M. *et al.* Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. **Nature**, v. 428, n. 6983, p. 653–657, 2004.
- MATTARUCCHI, E. *et al.* Different real time PCR approaches for the fine quantification of SNP's alleles in DNA pools: assays development, characterization and pre-validation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 555–562, 2005.
- MAUL, J. E. *et al.* The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. **Plant Cell**, v. 14, n. 11, p. 2659–79, 2002.
- MATTEI, L.F. Programa Nacional para produção e uso do biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 41, n. 4, p. 731–740, 2010.
- MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 47–54, 2002.
- MELIS, A. Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n.11–12, p.1217–1228, 2002.
- MERCHANT, S. S. *et al.* The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 245–250, 2007.
- MESLET-CLADIÈRE, L.; VALLON, O. Novel shuttle markers for nuclear transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 12, p. 1670–1678, 2011.
- MINKO, I. *et al.* Renilla luciferase as a vital reporter for chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 262, p. 421–5, 1999.
- MIYASHITA, H. *et al.* Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll d as the major chlorophyll. **Plant Cell Physiology**, v. 38, p. 274–281, 1997.
- MOLNAR, A. *et al.* Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Journal**, v. 58, n. 1, p. 165–174, 2009.
- MONNIER, A. *et al.* Orchestrated transcription of biological processes in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* exposed to light/dark cycles. **BMC Genomics**, v. 11, p. 192, 2010.
- MOTA, J. C. *et al.* Impactos e benefícios ambientais, econômicos e sociais dos biocombustíveis: uma visão global. **Engenharia Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 220–242, 2009.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

MUSSGUG, J. H. *et al.* NAB1 is an RNA binding protein involved in the light-regulated differential expression of the light-harvesting antenna of *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Cell**, v. 17, n. 12, p. 3409-3421, 2005.

NAKAMURA, Y. *et al.* The First Symbiont-Free Genome Sequence of Marine Red Alga, Susabi-nori (*Pyropia yezoensis*). **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1, 2013.

NAGAYA, S. *et al.* The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. **Plant Cell Physiology**, v. 51, p. 328-32, 2010.

NGUYEN, A.V. *et al.* Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, p. 1965-1979, 2008.

OELKERS, P. *et al.* The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 8877-8881, 2002.

ONG, Y.L.; IRVINE, A. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. **Hematology**, v. 7, p. 59-67, 2002.

OSTA, M. A.; CHRISTOPHIDES, G. K.; KAFATOS, F. C. Effects of mosquito genes on Plasmodium development. **Science**, v. 303, n. 5666, p. 2030-2032, 2004.

OUDET-LE SECQ, M. P. *et al.* Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 277, n. 4, p. 427-39, 2007.

PAGANI, I. *et al.* **The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4**: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. **NAR** 40, D571-9. 2012.

PALENIK, B. *et al.* The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 18, p. 7705-7710, 2007.

PHIL, J.C.; ATLAS, R.M. Bioremediation of contaminated soils and aquifers. In: **Bioremediation: Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup**. Washington: ASM Press, 2005. p. 1-49.

PINTO, A.C. *et al.* Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.

PLANCKE, C. *et al.* Lack of isocitrate lyase in *Chlamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth. **The Plant Journal**, v. 77, p. 404-417, 2013.

POLLE, J. E. W. *et al.* Photosynthetic apparatus organization and function in the wild type and a chlorophyll b-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Dependence on carbon source. **Planta**, v. 211, n. 3, p. 335-344, 2000.

PRICE, D. C. *et al.* *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. **Science**, v. 335, n. 6070, p. 843-847, 2012.

PROCHNIK, S. E. *et al.* Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. **Science**, v. 329, n. 5988, p. 223-226, 2010.

RADAKOVITS, R. *et al.* Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 4, p. 486-501, 2010.

RANGASAMY, D.; Ratledge, C. Genetic enhancement of fatty acid synthesis by targeting rat liver ATP:citratylase into plastids of tobacco. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1231–1238, 2000.

RAJAKUMARI, S. *et al.* Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 3, p. 157-171, 2008.

RATLEDGE, C. E; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p. 1-51, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 906.

READ, B. A. *et al.* Pan genome of the phytoplankton *Emiliania underpins* its global distribution. **Nature**, v. 499, n. 7457, p. 209-213, 2013.

ROCHA, M. J. B. **Do mecanismo de desenvolvimento limpo ao programa de atividades: uma análise do uso do biodiesel e da energia eólica no Brasil**. 2009. 142 p. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) – Coppe, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

ROCK, C. O.; JACKOWSKI, S. Forty years of bacterial fatty acid synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, n. 5, p. 1155-1166, 2002.

RODRIGUES, F. Laissez-faire. **Revista Biodieselbr**. v. 2, n. 7, p. 42-51. 2008.

ROESSLER, K. *et al.* Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. **Plant Physiology**, v. 113, n. 1, p. 75-81, 1997.

ROMOREN, K.; THU, B. J.; EVENSEN, O. Immersion delivery of plasmid DNA. II. A study of the potentials of a chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. **Journal of Controlled Release**, v. 85, p. 215-25, 2002.

ROBBENS, S. *et al.* The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tauri*: organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 4, p. 956-968, 2007.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 20, p. 1350-1354, 1985.

SANDAGER, L. *et al.* Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 8, p. 6478-6482, 2002.

SCHMIDT, C. W. Biodiesel: Cultivating Alternative Fuels. **Environmental Health Perspect**, v. 115, n. 2, p. A86–A91, 2007.

SCHÖNKNECHT, G. *et al.* Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. **Science**, v. 339, n. 6124, p. 1207-1210, 2013.

Sendl, A. *et al.* Inhibition of Cholesterol-Synthesis In vitro by Extracts and Isolated Compounds Prepared from Garlic and Wild Garlic. **Atherosclerosis**, v. 94, n. 1, p. 79-85, 1992.

SHAY, E.G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, p. 227-242, 1993.

SITEPU, I. R. *et al.* An improved high-throughput *Nile red* fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, p. 321–328, 2012.

SMITH D. R. *et al.* The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 83, 2010.

SUBRAHMANYAM, S.; CRONAN, J. E. Overproduction of a functional fatty acid biosynthetic enzyme blocks fatty acid synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4596-4602, 1998.

SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs development and disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, p. 725-737, 2008.

SUN, G. *et al.* Inhibition of pds gene expression via the RNA interference approach in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). **Marine Biotechnology**, v. 10, p. 219–226, 2008.

TOEPEL, J. *et al.* Construction and evaluation of a whole genome microarray of *Chlamydomonas reinhardtii*. **BMC Genomics**, v. 12, p. 579, 2011.

UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME (UNDP). **Human Development Report 2007/2008**. Fighting climate change: Human solidarity in a divided world. UNDP, New York, EUA. 2007.

VERWOERT, I. I. *et al.* Modification of *Brassica napus* Seed Oil by Expression of the *Escherichia coli* fabH Gene, Encoding 3-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III. **Plant Molecular Biology**, v. 27, n. 5, p. 875-886, 1995.

WEISZ, P. B.; HAAG, W. O., RODEWELD, P. G. Catalytic production of high-grade fuel (gasoline) from biomass compounds by shape selective catalysis. **Science**, v. 206, n.4414, p. 57-58, 1979.

VIEIRA, S.S. **Produção de biodiesel via esterificação de ácidos graxos livres utilizando catalisadores heterogêneos ácidos**. 117 p. 2011. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

TAKAGI, M. *et al.* Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 223-226, 2006.

THAMATRAKOLN, K. *et al.* Whole-genome expression analysis reveals a role for death-related genes in stress acclimation of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 67-81, 2012.

TORNABENE, T. G. *et al.* Lipid-Composition of the Nitrogen Starved Green-Alga *Neochloris oleoabundans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 6, p. 435-440, 1983.

TSENG, C. K. Algal biotechnology industries and research activities in China. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 375-380, 2001.

VAN, K.; SPALDING, M. H. Periplasmic carbonic anhydrase (cah1) structural gene mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, v. 120, p. 757-64, 1999.

WAKASUGI, T. *et al.* Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 11, p. 5967-5972, 1997.

WEI, L. *et al.* *Nannochloropsis* plastid and mitochondrial phylogenomes reveal organelle diversification mechanism and intragenus phylotyping strategy in microalgae. **BMC Genomics**, v. 14, p. 534, 2013.

WORDEN, A. Z. *et al.* Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 268-72, 2009.

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

ZHANG, Y.; ADAMS, I. P.; RATLEDGE, C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2013-2025, 2007.

ZOU, J. T. *et al.* Modification of seed oil content and acyl composition in the brassicaceae by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene. **The Plant Cell**, v. 9, n. 6, p. 909-923, 1997.

8. SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Helena Dias Müller Villela

Data de nascimento: 09/10/1987

Naturalidade: Rio de Janeiro

Nacionalidade: Brasileira

Email: hdmvillela@gmail.com

2. FORMAÇÃO

2003 – 2005 (Concluído)

Ensino médio. Colégio Santa Mônica Centro Educacional, Rio de Janeiro, Brasil.

2006 – 2010 (Concluído)

Bacharelado em Ciências Biológicas (Modalidade Genética). Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

2011 – 2014 (Em andamento)

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica). Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

3. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- Professora voluntária de biologia no projeto “Construindo o Saber” pela ONG “Eu Penso no Futuro”. Período: mar/2008 – dez/2010;

- Realização de estágio no Laboratório Nacional de Los Alamos de out/11 a fev/12 sob supervisão do Dr. Richard Sayre; e de Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) financiado pela Fapesp, no mesmo laboratório de jan/13 à jul/13;
- Revisora de artigo da revista “Brazilian Journal of Microbiology (BJM)”. Período: 2013;
- Participação como pesquisadora na “Operação Antártica Brasileira XXXII”. Período: dez/2013.

4. PUBLICAÇÕES

4.1 Resumos em congressos durante o período do mestrado:

- **VILLELA H.D.M.**, Tonon A.P., Colepicolo P. (2011). Apresentação de pôster no III Workshop da Rede Algas com o trabalho intitulado “Análise da Produção e do Padrão de Lipídios em *Chlamydomonas reinhardtii* em Diversas Condições visando a Produção de Biodiesel”. Arcozelo – RJ.
- **VILLELA H.D.M.**, Tonon A.P., Samrakandi M., Sayre R., Colepicolo P. (2012). Apresentação de pôster no XIV Congresso Brasileiro de Ficologia com o trabalho intitulado “Utilização das Técnicas de engenharia genética e bioquímica em *Chlamydomonas reinhardtii* visando o aumento da produção de lipídios para obtenção de biocombustível”. João Pessoa – PA.

- **VILLELA H.D.M.** (2012). Palestra intitulada “Produtividade Acadêmica: experiência nos Estados Unidos” no II Congresso Institucional de Química e Bioquímica.
- **VILLELA H.D.M.**, Tonon A.P., Samrakandi M., Sayre R., Colepicolo P. (2013). Apresentação de pôster no “3rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts” com o trabalho intitulado “Engineering *Chlamydomonas reinhardtii* for Increased Lipid Production”. Toronto – Canadá.
- **VILLELA H.D.M.**, Tonon A.P., Samrakandi M., Sayre R., Colepicolo P. (2013). Apresentação oral em língua inglesa no “5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives” com o trabalho “Genetic Engineering in *Chlamydomonas reinhardtii* Aiming to Increase the Lipid Amount for Biofuel Production”. Ilha Bela – SP.

4.2 Artigos científicos

- Cury J.C., Jurelevicius D.A., **VILLELA H.D.M.**, Jesus H.E., Peixoto R.S., Schaefer C.E.G.R., Bicego M.C., Seldin L., Rosado A.S. Microbial diversity and hydrocarbon depletion in low and high diesel-polluted soil samples within the vicinity of the Brazilian Antarctic Station. Publicado.

- Tonon A.P., Zaini P.A., Falcão V.R., **VILLELA H.D.M.**, de Oliveira M.C., Collén J., Boyen C., Colepicolo P. Acclimation of the seaweed *Gracilaria tenuistipitata* to exposition to copper and cadmium. Submetido.
- Simas-Rodrigues C., **VILLELA H.D.M.**, Martins A.P., Marques L.G., Arruda D., Colepicolo P., Tonon A.P. Microalgae for economic applications: advantages and perspectives of bioethanol. Em preparação.
- **VILLELA H.D.M.**, Tonon A.P., Samrakandi M., Sayre R., Colepicolo P. Underexpression of the Glyoxylate Cycle enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii* results in increased neutral lipids storage. Em preparação.