UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

ROBERTA FERNANDES PINTO

INFLUÊNCIA DO FOSFATO NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E ACÚMULO DE LIPÍDEOS NA MICROALGA CLOROFÍCEA ANKISTRODESMUS

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

Rio de Janeiro 2017

Roberta Fernandes Pinto

INFLUÊNCIA DO FOSFATO NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E ACÚMULO DE LIPÍDEOS NA MICROALGA CLOROFÍCEA ANKISTRODESMUS

Tese de Doutorado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências



Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências da Saúde Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho 2017

Roberta Fernandes Pinto

INFLUÊNCIA DO FOSFATO NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E ACÚMULO DE LIPÍDEOS NA MICROALGA CLOROFÍCEA ANKISTRODESMUS

Tese de Doutorado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientadores: Wanderley de Souza Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências da Saúde Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho 2017 Pinto, Roberta Fernandes

Influência do fosfato no crescimento, morfologia e acúmulo de lipídeos na microalga clorofícea *Ankistrodesmus* / Roberta Fernandes Pinto.

Rio de Janeiro, 2017.

yyyy, n f.: il.

Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica, 2017).

> Orientadores: Wanderley de Souza e Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

 Microalga Ankistrodesmus. 2. Fosfato. 3. Grânulos de polifosfato. 4. Lipídeos. 5. Microscopia. I. Souza, Wanderley de e Azevedo, Sandra Maria Feliciano de Oliveira e. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título

"INFLUÊNCIA DO FOSFATO NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E ACÚMULO DE LIPÍDEOS NA MICROALGA CLOROFÍCEA ANKISTRODESMUS"

ROBERTA FERNANDES PINTO

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

RIO DE JANEIRO, 11 DE MAIO DE 2017. APROVADA POR

PROF^a. ANA PAULA CABRAL DE ARAUJO LIMA (DOUTORA – UFRJ) COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

PROF. WANDERLEY DE SOUZA (DOUTOR – UFRJ) ORIENTADOR

PROF^a. SANDRA MARIA F. DE OLIVEIRA E AZEVEDO (DOUTORA – UFRJ) ORIENTADORA

PROF^a. ANA BEATRIZ FURLANETTO PACHECO (DOUTORA – UFRJ)

PROF. ULYSSES GARCIA CASADO LINS (DOUTOR – UFRJ) – (MEMBRO EXTERNO)

PROF^a.MARIÂNGELA MENEZES (DOUTORA – UFRJ) – MEMBRO EXTERNO

PROF. NORTON HEISE (DOUTOR – UFRJ) – (REVISOR)

PROF. SONIA ROZENTHAL (DOUTORA – UFRJ) – (SUPLENTE INTERNO)

PROF^a. ANA TERESA LOMBARDI (DOUTORA – UFSC) – (SUPLENTE EXTERNO

A todos que me forneceram apoio nesta caminhada e àqueles que, de alguma forma, contribuíram com a minha formação pessoal e científica.

"Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida." Carlos Chagas (1928)

AGRADECIMENTOS

Aos meus professores orientadores Sandra Azevedo e Wanderley de Souza pela disponibilidade mesmo dentre tantas responsabilidades, pelo incentivo, pelos exemplos e pelos ensinamentos, o meu mais sincero agradecimento.

Aos professores da Universidade Estadual do Norte Fluminense que fazem parte da minha formação e da minha história, em especial aos professores Maria Luisa López e Claudio Andrés Retamal (*in memorian*) que me acompanharam durante a iniciação científica e mestrado, e que ensinaram muito além da Biologia e do laboratório, mas lições de vida, valores, companheirismo e responsabilidade.

À minha família por entender a minha ausência, minhas necessidades e decisões e por me apoiar nos momentos difíceis.

Ao INMETRO, pela concessão de bolsa, por ter permitido meu crescimento profissional, além de ter me trazido valiosos amigos e companheiros que me apoiaram e ensinaram muito durante esta jornada.

À UFRJ por ter me fornecido muito mais que uma estrutura necessária ao aprendizado.

Às instituições de fomento FAPERJ e CNPq, pela concessão das bolsas.

Ao amigo Ricardo Guedes por toda a companhia, parceria, cafés, boa vontade e gentileza em qualquer momento, mesmo aos sábados, domingos ou feriados.

Às mais que amigas, irmãs, Luciane Brandão, Carolina Tolomini, Iamê Alves e Roberta Guedes pela grande amizade, pelo companheirismo em momentos inesquecíveis, alegres ou tristes da vida, e pelo apoio no dia a dia, com comidinha, café ou brigando comigo para o meu crescimento.

Aos companheiros Ricardo Rogers, Daniel Vinicíus e Mauro Villar por seus ensinamentos estatísticos, biofísicos e pelas longas discussões de diferentes aspectos dos nossos trabalhos.

Aos companheiros Andreia, Luciana Rangel, Alan Amorim, Elisângela, Priscila, Ramon, Vitor, Ana Pimentel, Ana Lúcia, Isabel, Rafael Rosas, Elisabeth pela agradável convivência durante toda esta jornada de LETC.

Às professoras Valéria Magalhães e Raquel Soares por todo apoio e força.

VIII

Aos amigos da BIO 2005 UENF, que hoje fazem parte da minha grande família, meu agradecimento por toda força e estímulo, com palavras ou com exemplos, para seguir em frente.

Aos amigos e companheiros de LABIO INMETRO, Vânia Vieira, Paulo Roberto, Rafaela Carrillo, Luis Sérgio, Luiz, Ricardo Vilella, Elivaldo, Flávio e todos do LABIO, pela companhia nos trabalhos em equipe e nos cafés.

Aos pesquisadores Celso Sant'Anna, Daniele Cavalcante, Juliana Lopes e Júlio Jablonski, Susana Frasés por todo o apoio, colaboração, compreensão e por me permitirem participar desta equipe.

À aluna de iniciação científica Verônica da Silva pela sua brilhante atuação e dedicação, mesmo na minha grande ausência.

Aos alunos do curso de Biotecnologia do Colégio Estadual Círculo Operário, que me fizeram crescer sempre, aprendendo com eles em nossas aulas práticas e teóricas, que hoje me fazem mais feliz ao vê-los como alunos da UFRJ e futuros colegas de profissão.

À Marlene Benchimol, por sua importante contribuição em minha vida pessoal e científica.

Ao Paulo Crepaldi, pela paciência e tranquilidade na execução dos seus maravilhosos trabalhos, pelos grandes ensinamentos no processamento de imagens e por sua ilustre contribuição na premiação de imagens do CNPq.

À professora Ana Beatriz Pacheco, que sempre contribuiu de forma elegante com as suas ideias.

Aos professores do LUCHM, que sempre me receberam de braços abertos e dispostos a ajudar.

Ao professor Kildare Miranda por seus valiosos ensinamentos, apoios e cobranças, que sempre me fizeram refletir e crescer profissionalmente.

Às técnicas Noêmia do LUCHM e Mariana do CENABIO, que contribuíram de forma valiosa na conclusão deste trabalho.

Aos técnicos em microscopia Fernando, Daniel e ao professor Ulysses Lins, pelo apoio e incentivo ao meu trabalho.

A professora Georgia Atella por sua colaboração, pelo valioso apoio científico, permitindo o uso do seu laboratório e pela dedicação seu tempo sempre com muito entusiasmo. À técnica Mileane Busch pelas valiosas análises de cromatografia gasosa, pela paciência em sempre me explicar tudo muito claramente e por me ajudar sempre com muita atenção e carinho.

À Clarice Casanova pelo apoio e fornecimento de reagentes fundamentais na conclusão deste trabalho.

Ao pesquisador Jacques Werckmann pela sua disponibilidade e boa vontade e ao CBPF, pela permissão de uso de um dos seus microscópios.

Às amigas Sabrina Calado, Verônica Parente, Laura Pereira e Isabele Almeida por toda amizade, paciência, compartilhamentos de sorrisos e momentos alegres.

Àqueles que me acompanharam, em parte desta tese ou da minha vida, mas que não foram nominalmente citados, porém jamais esquecidos, o meu: muito obrigada!

RESUMO

Pinto, Roberta Fernandes. Influência do fosfato no crescimento, morfologia e acúmulo de lipídeos na microalga clorofícea *Ankistrodesmus*. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Microalgas têm sido utilizadas para diferentes aplicações biotecnológicas, tais como produção de lipídeos para biocombustíveis, produção de carotenóides, vitaminas e pigmentos. Estas aplicações favoreceram estudos sobre o metabolismo e estrutura de alguns destes organismos. Atualmente, sabe-se que a redução de nutrientes do cultivo, como, por exemplo, a redução de fósforo, promove o acúmulo de lipídeos neutros, do tipo triacilgliceróis, em corpos lipídicos em linhagens de microalgas clorofíceas. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo selecionar, caracterizar e avaliar uma linhagem de clorofícea cultivada sob diferentes concentrações de fosfato no meio, visando o acúmulo de lipídeos de interesse na produção de biocombustíveis. Foram previamente escolhidas as linhagens de Ankistrodesmus, Monoraphidium e Scenedesmus. As três linhagens foram observadas por microscopia eletrônica de varredura e apresentaram finas estruturas ainda não descritas na extremidade das células de Ankistrodesmus e Scenedesmus, bem como estruturas da parede de Monoraphidium e Ankistrodesmus. Com base no acúmulo de corpos lipídicos e do fosfato intracelular (sob a forma de grânulos de polifosfato), foi selecionada como linhagem de trabalho a microalga Ankistrodesmus, identificada por análises moleculares da sequência da subunidade maior (LSU) do DNA ribossômico (rDNA)como Ankistrodesmus stipitatus. A microalga selecionada foi avaliada quanto ao crescimento, volume médio, clorofila, taxa fotossintética, captação de fosfato do meio, alterações nos grânulos de polifosfato e a relação entre estes e o acúmulo de lipídeos sob diferentes concentrações de fosfato no meio, bem como dos principais ácidos graxos. Foi verificado que a ausência de fosfato no meio promoveu uma pequena redução no crescimento, variações no biovolume médio, mas, mesmo sem afetar a concentração de clorofila por célula reduziu a atividade fotossintética. Após a adição de fosfato no meio, as células apresentaram retomada no crescimento, redução no biovolume médio, aumento da atividade fotossintética e redução na quantidade de lipídeos. Foi verificado que o consumo dos grânulos de polifosfato em Ankistrodesmus causou alteração na morfologia destes, fazendo com que estes adquiram um formato de meia lua ou apresentem a região central dos grânulos menos elétron densa. Além disto, foi observado um acúmulo de material de natureza lipídica junto aos grânulos de polifosfato, indicando uma relação direta entre estes e os corpos lipídicos. A ausência de fosfato no meio promoveu aumento no acúmulo de lipídeos neutros e favoreceu o acúmulo de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, onde os 5 principais ácidos graxos encontrados correspondiam a 80% do total, sendo estes C18:3, C18:1, C16:0, C18:2 e C16:5. Assim sendo, conclui-se que o fosfato acumulado intracelularmente é capaz de suportar o crescimento da microalga Ankistrodesmus, existe uma relação direta entre a formação dos corpos lipídicos e os grânulos de polifosfato e, a ausência de fosfato no meio de cultivo favorece o acúmulo de ácidos graxos de interesse na produção de biocombustíveis. Em resumo, com este trabalho identificamos que Ankistrodesmus stipitatus é apropriada para utilização no desenvolvimento de biocombustíveis e pode ser um modelo para compreender melhor a função dos grânulos de polifosfato em microalgas.

Palavras-chave: Microalgas; Ankistrodesmus; Fosfato; Corpos de polifosfato; Lipídeos; Microscopia.

ABSTRACT

Pinto, Roberta Fernandes. Phosphate influence on growth, morphology and lipid accumulation in a chlorophyceae microalgae, *Ankistrodesmus*. Dissertation (Ph.D. in Science) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Microalgae have been used in different biotechnological applications, such as lipid production for biofuels, and production of carotenoid, vitamins and pigments. These applications favor studies on metabolism and structure of some of these microrganisms. Currently, it is known that diminishing nutrients in the medium, such as phosphate, promotes the accumulation of neutral lipids, such as triacylglycerols, inside lipid bodies in lineages of Chlorophycea microalgae. Therefore, the objective of this study was to select, characterize and evaluate a lineage of Chlorophyceae cultivated in medium with different phosphate concentrations, aiming for the accumulation of lipids that are of interest in biofuels production. The Ankistrodesmus, Monoraphidium, and Scenedesmus strains were previously selected. The three strains were observed by scanning electron microscopy and showed thin structures not yet described at the end of the cells of Ankistrodesmus and Scenedesmus, as well as wall structures of Monoraphidium and Ankistrodesmus. Based on the accumulation of lipid bodies and intracellular phosphate in the form of polyphosphate granules, Ankistrodesmus was selected as working strain, which was identified by molecular analysis of the sequence from the large subunit (LSU) from ribosomal DNA (rDNA) as Ankistrodesmus stipitatus. The selected microalgae were evaluated for growth, average volume, chlorophyll, photosynthetic rate, phosphate uptake from the medium, changes in polyphosphate granules, relationship between them and lipid accumulation under different concentrations of phosphate in the medium, and most common fatty acids. It was established that the absence of phosphate in the medium promoted a small diminishing in growth, variations in the average biovolume, but even without affecting the concentration of chlorophyll per cell, it diminished its photosynthetic activity. After addition of phosphate in the medium, the cells showed growth recovery, reduction in the average biovolume, elevation of photosynthetic activity and diminishing of lipids. It was observed that consumption of polyphosphate granules in Ankistrodesmus alters their morphology, allowing them to acquire a half-moon shape or present a central region less electron dense than the other part of the granule. Also, an accumulation of lipidic material was observed next to the polyphosphate granules, suggesting a direct relationship between these and the lipid bodies. Absence of phosphate in the medium promoted an increase in the accumulation of neutral lipids and favored the accumulation of saturated and monounsaturated fatty acids, with the five main fatty acids found corresponding to 80% of the total, being these C18: 3, C18: 1, C16: 0, C18: 2, and C16: 5. It is concluded that intracellularly accumulated phosphate is capable of supporting the growth of Ankistrodesmus microalgae, with a direct relationship between formation of lipid bodies and polyphosphate granules, and that the absence of phosphate in the culture medium favors the accumulation of fatty acids of lipids of interest for the production of biofuels. In summary, with this work we identified that Ankistrodesmus stipitatusis apropriated for utilization in the development of biofuels and can be a model to understand better the function of polyphosphate granules in microalgae.

Keywords: Microalgae; Ankistrodesmus; Phosphate; Polyphosphate bodies; Lipids; Microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.17: Curva de calibração de fosfato pelo método espectrofotométrico......54

Figura 4.20: Marcação dos grânulos de polifosfato com DAPI em Ankistrodesmus.....56

Figura	4.22:	Organização	dos	grânulos	elétron	densos	na	microalga	Ankistra	odesmus
(ANRF	-01) ol	bservada por i	image	em espect	roscópic	ca				

Figura	4.23:	Variação	na	morfologia	dos	grânulos	de	polifosfato	de
Ankistro	desmus			•••••			•••••		60

Figura 4.42: Variação percentual dos 12 ácidos graxos majoritários nas condições *Com fosfato*, *Sem fosfato* e *Fosfato adicionado*, ao longo de 26 dias de cultivo......90

Figura 4.45:	Variação	dos ácidos	graxos	saturados,	MUFAS	e PUFAS	ao longo	de 26
dias								94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Fração de fósforo em compostos contendo fósforo nas células07
Tabela 1.2: Formação de corpos lipídicos em diferentes tipos celulares14
Tabela 4.1: Análises morfométricas dos grânulos de polifosfato da microalga
Ankistrodesmus
Tabela 4.2: Variação qualitativa dos ácidos graxos em Ankistrodesmus nas diferentes
condições de cultivo (Com fosfato, Sem fosfato e Fosfato adicionado)87
Tabela 4.3: Variação dos lipídeos majoritários detectados na microalga Ankistrodesmus
nas diferentes condições de cultivo (Com fosfato, Sem fosfato e Fosfato adicionado)
avaliados em diferentes tempos

SUMÁRIO

1.	INTR	ODUÇÃO0	1
	1.1	MICROALGAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS0	1
	1.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS D	E
		CLOROFÍCEAS0	2
		1.2.A) GÊNERO ANKISTRODESMUS CORDA	4
	1838.		2
		1.2.B) GÊNERO <i>MONORAPHIDIUM</i> KOMÁRKOVÁ	Y-
	LEGI	NEROVÁ 19690	3
		1.2.C) GÊNERO SCENEDESMUS MEYER	N
	1829.	04	1
	1.3	O FÓSFORO NO METABOLISMO DE MICROALGAS0	6
	1.4	ESTOQUE DE FÓSFORO EM GRÂNULOS D	E
		POLIFOSFATO (POLIP)0	9
	1.5	ACÚMULO E FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS1	3
	1.6	O USO POTENCIAL DOS LIPÍDEOS DE MICROALGA	S
		COMO BIOCOMBUSTÍVEIS1	5
	1.7	LIPÍDEOS DE MICROALGAS E BIODIESEL10	6
2.	OBJE	TIVO GERAL2	2
	2.1 0	BJETIVOS ESPECÍFICOS2	2
3.	MAT	ERIAL E MÉTODOS2	3
	3.1	CULTIVO E ESCOLHA DA LINHAGEM DI	E
TRAI	BALHO)	3
	3.2	IDENTIFICAÇÃO DA CEPA DE ANKISTRODESMUS24	4
	3.3	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, VOLUME CELULAI	R
MÉD	IO E B	IOVOLUME24	5
	3.4	QUANTIFICAÇÃO DA CLOROFILA2	6
	3.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA2	7
	3.6	DETERMINAÇÃO DO FOSFATO DISSOLVIDO2	7
	3.7	MICROSCOPIA ÓPTICA - CAMPO CLARO	3

3.8	MICROSCOPIA F	ELETRÔN	ICA DE VA	RREDURA	
3.9	DETECÇÃO DE I	LIPÍDEOS	NEUTROS	POR MICRO	SCOPIA DE
FLUORESCÊ	NCIA	•••••	••••••		29
3.10	DETECÇÃO	DE	LIPÍDEOS	NEUTRO	S POR
FLUORIMET	'RIA		•••••	•••••	29
3.11	LOCALIZAÇÃO		DOS	COMPAR	TIMENTOS
ÁCIDOS/POL	JFOSFATO	USANI	00 N	IICROSCOPL	A DE
FLUORESCÊ	NCIA	•••••	••••••	••••••	30
3.12	OBSERVAÇÃO	DOS GR	ÂNULOS I	DE POLIFOS	FATO POR
MICROSCOP	PIA ELETRÔNICA	A DE TRA	NSMISSÃO	••••••	
• DE	TECÇÃO DO PO	LIFOSFA	TO EM CÉL	ULAS INTEIF	RAS30
• DE	TERMINAÇÃO	DOS ELI	EMENTOS	QUÍMICOS I	PRESENTES
NOS GRÂNU	LOS DE POLIFO	SFATO U	TILIZAND	O A MICROA	NÁLISE DE
RAIOS-X	••••••	••••••	•••••	••••••	31
3.13	OBSERVAÇÃO	DOS G	RÂNULOS	DE POLIFO	OSFATO E
LIPÍDEOS	USANDO MI	ICROSCO	OPIA DE	ELETRÔN	NICA DE
TRANSMISS	ÃO	•••••		•••••	32
• CI	FOQUÍMICA D	E LIPÍD	DEOS – 7	FÉCNICA D	O ÓSMIO-
IMIDAZOL	•••••••		•••••	••••••	
• CO	ONTRASTAÇÃO E	EM BLOC	0	••••••••••••••••••	32
• CO	ONGELAMENTO	ULTRA-	RÁPIDO C	OM ALTA P	RESSÃO E
SUBSTITUIÇ	ÃO A FRIO		•••••	•••••	
3.14	PREPARO DA	AMOSTI	RA PARA	A CROMA	TOGRAFIA
GASOSA		••••••			34
• EX	TRAÇÃO DOS LI	PÍDEOS "	FOTAIS	••••••	
• PR	EPARO DOS ÉS	TERES M	IETILADOS	5 DOS ÁCIDO	S GRAXOS
(TRANSESTE	ERIFICAÇÃO)	•••••			34
• ID]	ENTIFICAÇÃO	E QU	ANTIFICA	ÇÃO DOS	LIPÍDEOS
UTILIZANDO) A CROM	ATOGRA	FIA GAS	OSA ACOI	PLADA À
ESPECTROM	IETRIA DE MASS	SAS (GC-N	AS)	••••••••••	35
3.15 AN	NÁLISES ESTATÍ	STICAS	•••••	••••••	36

4. RESULTADOS
PARTE I – IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS
ESTUDADAS
4.1 OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA37
4.2 OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA
4.3 SELEÇÃO DA LINHAGEM DE ESTUDO ATRAVÉS DA
MARCAÇÃO DE LIPÍDEOS NEUTROS USANDO MICROSCOPIA DE
FLUORESCÊNCIA E FLUORIMETRIA42
4.4 DETECÇÃO DOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO EM CÉLULAS
INTEIRAS DE ANKISTRODESMUS, SCENEDESMUS E
MONORAPHIDIUM
4.5 IDENTIFICAÇÃO DA CEPA DE <i>ANKISTRODESMUS</i> POR
BIOLOGIA MOLECULAR45
PARTE II – AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS DA LINHAGEM DE
ANKISTRODESMUS
4.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E BIOVOLUME DA LINHAGEM
DE ANKISTRODESMUS
4.7 ANÁLISE DA CLOROFILA E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA50
4.8 ANÁLISE DO FOSFATO DISSOLVIDO NO MEIO52
PARTE III – ANALISES DOS GRANULOS DE POLIFOSFATO EM
ANKISTRODESMUS
4.9 DETECÇÃO DOS GRANULOS DE POLIFOSFATO POR
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA
4.10 OBSERVAÇÃO DOS GRANULOS DE POLIFOSFATO POR
MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSAO
4.11 OBSERVAÇÃO DE CELULAS INTEIRAS DE
ANNISIKUUESMUS
4.12 MUKFUMETKIA DUS GKANULUS DE PULIFUSFATU EM
ANNISI KUDESMUS

	4.13 COMPOSIÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS NOS GRÂNULOS
DE	POLIFOSFATO61
PAI	RTE IV – ANÁLISES DOS LIPÍDEOS DE <i>ANKISTRODESMUS</i> EM
DIF	ERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO65
	4.14 DETECÇÃO DE LIPÍDEOS POR FLUORIMETRIA65
	4.15 DETECÇÃO DE LIPÍDEOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL E
ELI	ETRÔNICA DE TRANSMISSÃO66
	4.16 ANÁLISE QUALITATIVA DOS ÉSTERES METILADOS DE
ÁC	DOS GRAXOS DE <i>ANKISTRODESMUS</i> POR CROMATOGRAFIA
GAS	SOSA
5.	DISCUSSÃO95
6.	CONCLUSÕES112
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS113

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 MICROALGAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Microalgas são encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, sendo considerados por alguns autores como responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (Chisti, 2004). Os grupos mais abundantes e com grande potencial para a exploração econômica devido às suas moléculas de alto valor comercial, segundo Khan e colaboradores (2009) são: diatomáceas (Bacillariophyceae), algas verdes (Chlorophyceae) e algas douradas (Chrysophyceae). Organismos desses grupos são encontrados com uma grande variabilidade de morfologias e tamanhos, além de um grande número de espécies. Estima-se que o número de espécies marinhas, por exemplo, varie entre 4000 e 5000 (Reynolds, 2006).

O termo alga não designa uma descrição taxonômica, mas inclui organismos que realizam fotossíntese oxigênica, possuem clorofila *a* e outros pigmentos fotossintéticos (Raven *et al.*, 2001; Greenwell *et al.*, 2010). As microalgas são classificadas segundo critérios como pigmentos, natureza química dos produtos de reserva, constituintes da parede celular, ciclos de vida e estrutura celular básica (Brennan e Owende, 2010). Também têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do(s) cloroplasto(s) e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear. Além destes, técnicas de biologia molecular igualmente têm sido usadas para classificar as microalgas (Hu, 2004), porém as revisões relativas à genética e ultraestrutura geram complexidade à história evolutiva e à taxonomia de microalgas.

Alguns destes organismos são mixotróficos requerendo precursores orgânicos para a síntese das suas próprias células, porém a maioria é de organismos autotróficos, capazes de utilizar a energia luminosa para sintetizar adenosina trifosfato (ATP). Estes são produtores primários do carbono orgânico, portanto são capazes de reduzir o dióxido de carbono como uma fonte de carbono celular (fotossíntese). Para isto, utilizam a água como fonte dos elétrons redutores e liberam o oxigênio como um subproduto.

Os três gêneros de microalgas utilizados neste trabalho pertencem às algas verdes ou clorofíceas, sendo estes organismos eucariotos fotossintetizantes muito diversos, pertencentes à comunidade fitoplanctônica presente em quase todos os ambientes aquáticos, sendo elas: *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium* e *Scenedesmus*.

1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE CLOROFÍCEAS

As clorofíceas ou algas verdes podem se apresentar sob a forma de organismos unicelulares, coloniais e filamentosos, e têm como organela de maior destaque o cloroplasto. Este confere coloração esverdeada à alga devido à presença de clorofila a e b, porém algumas espécies podem apresentar coloração amarela esverdeada, devido à presença de carotenóides (Van Vuuren *et al.*, 2006).

O cloroplasto pode apresentar diferentes morfologias, dependendo da espécie, sendo a sua morfologia um dos critérios de identificação taxonômica. Este pode conter um ou mais pirenóides, que acumulam amido como fonte de reserva, já que essas algas têm como produto de armazenamento amido ou lipídeos (Reynolds, 2006).

As células estão envolvidas por uma parede celular, composta de celulose, juntamente com outros polissacarídeos e proteínas. Estas podem ser imóveis ou nadar ativamente por meio de dois ou quatro flagelos anteriores, que são em sua maioria suaves e iguais em comprimento (Van Vuuren *et al.*, 2006).

As clorofíceas compreendem o maior grupo de algas quando considerados a abundância de gêneros, espécies e frequência de ocorrência. Elas crescem em águas com diferentes salinidades, variando de águas doces oligotróficas até as marinhas e supersaturadas em solutos (Van Vuuren *et al.*, 2006). São em sua maioria aquáticas, comumente encontradas em águas doces tropicais e têm seu crescimento rápido, o que facilita o cultivo para obtenção de seus subprodutos.

Neste trabalho, foram inicialmente utilizados três diferentes gêneros de clorofíceas, que são descritos abaixo:

1.2.A GÊNERO ANKISTRODESMUS CORDA 1838

O nome do gênero *Ankistrodesmus* se origina do grego *Ankistron* ou anzol, juntamente com *desmos* ou ligação. Neste gênero, as células têm finas paredes celulares, estão torcidas em torno de si em pequenos grupos ou estão frouxamente agrupadas em colônias, que podem variar de 4 até 32 células (Bicudo e Menezes, 2006; Van Vuuren *et al.*, 2006) (**Figura 1.1a**).

Geralmente apresentam-se reunidas em colônias menos organizadas sob a forma de tufos ou mais ordenadas sob a forma de feixes frouxos, pois elas estão ligadas umas às outras apenas pela área central da célula, podendo estar paralelas às outras ou radialmente organizadas. As células podem se torcer espiraladamente umas sobre as outras ao formar o feixe, dando uma aparência estrelada à colônia. As células jovens são geralmente encontradas em um arranjo de cruz, enquanto células mais velhas são geralmente solitárias (Van Vuuren *et al.*, 2006).

As células tem aparência semelhante a agulhas, visto que podem ser retas, alongadas ou sigmóides, algumas são lunadas, fusiformes e muito longas. Estas apresentam dimensões de 25 a 60 μ m de comprimento e 1 a 6 μ m de largura (Van Vuuren *et al.*, 2006) e não apresentam mucilagem. O cloroplasto é único, com a forma de lâmina, e parietal, localizando-se lateralmente nas células. O pirenóide, que consiste de uma região especializada do cloroplasto com uma grande concentração da enzima ribulose-1-5-bifosfato carboxilase (RUBISCO) (Osafune *et al.*, 1990), pode variar de um a muitos (condição rara), podendo estar presente ou ausente. A reprodução assexuada ocorre pela formação de autósporos e não se conhece reprodução sexuada, nem estágios flagelados (Bicudo e Menezes, 2006).

O gênero inclui 11 espécies, que já foram encontradas em quase todo o mundo, constando entre os gêneros mais cosmopolitas de algas Chlorococcales e um dos mais comuns em coletas de plâncton (Bicudo e Menezes, 2006). São bastante comuns em corpos d'água eutrofizados.



Figura 1.1: Desenhos de alguns representantes das clorofíceas dos gêneros Ankistrodesmus, Monoraphidium e Scenedesmus. a - Desenho de um representante do gênero Ankistrodesmus Corda 1838;
b - Desenho de um representante do gênero Monoraphidium Komárková-Legnerová 1969; c - Desenho de um representante do gênero Scenedesmus Meyen 1829 (Bicudo e Menezes, 2006).

1.2.B GÊNERO *MONORAPHIDIUM* KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ 1969

As células de *Monoraphidium* são muito similares às de *Ankistrodesmus*, porém as primeiras geralmente são solitárias, sendo encontradas reunidas em pares ou tétrades, apenas em um curto intervalo de tempo, resultantes do processo de reprodução (Bicudo e Menezes, 2006).

O nome do gênero tem origem grega em "*monõsis*" ou único e "*raphidos*" de agulha ou pinos (Van Vuuren *et al.*, 2006), indicando células geralmente solitárias e seu formato mais ou menos fusiformes, às vezes cilíndricas, várias a muitas vezes mais longas que o próprio diâmetro, podendo ser tanto retas quanto encurvadas ou até sigmóides (**Figura 1.1b**). Neste gênero, as células são em forma de agulha ou foice, em linha reta, curvada, sigmoidal ou em espiral, muitas vezes ambas as extremidades são igualmente pontiagudas ou curvas. Algumas afilam gradualmente para as extremidades, fazendo com que os pólos sejam mais agudos, já quando o fazem repentinamente, os pólos podem ser levemente arredondados (Bicudo e Menezes, 2006).

O cloroplasto é único e parietal, localizando-se lateralmente na célula e revestindo internamente toda a parede celular sob a forma de lâmina. Células mais velhas têm o cloroplasto mais afastado dos pólos e da região mediana da célula. Mesmo nas células jovens, há uma reentrância lateral mediana do plastídio, em que o núcleo fica situado (Bicudo e Menezes, 2006).

As células têm comprimentos variando entre 2-182 μ m e diâmetro de 1-8 μ m, são uninucleadas, não apresentam mucilagem ou flagelos e têm uma parede celular fina e lisa. Algumas espécies podem apresentar um pirenóide localizado na parte central da célula, mas este não é visível quando examinadas por microscopia óptica. Quando está presente, o pirenóide não tem um envelope de amido. Sua reprodução é por autósporos (Van Vuuren *et al.*, 2006).

Atualmente, este gênero possui 21 espécies, que estão entre as mais cosmopolitas entre as Chlorococcales, já tendo sido coletadas do plâncton e do metafíton de ambientes oligo a mesotróficos em quase todo o mundo (Bicudo e Menezes, 2006). Alguns autores relatam que é comum que estes sejam encontrados em ambientes eutróficos na África (Van Vuuren *et al.*, 2006).

1.2.C GÊNERO SCENEDESMUS MEYEN 1829

Scenedesmus é o gênero mais comum e cosmopolita de algas verdes, sendo o primeiro a colonizar ambientes, sendo encontrados em lagos de águas doces, lagoas e rios e, geralmente, em águas com baixa salinidade ou levemente ácidas. Seus indivíduos estão presentes em todos os climas, mas preferem águas eutróficas a hipereutróficas (Van Vuuren *et al.*, 2006).

A palavra *Scenedesmus* tem origem latina, onde "*Skene*" significa toldo e "*desmos*" ligação (Van Vuuren *et al.*, 2006). O gênero se caracteriza por células

alongadas e cilíndricas, que se arranjam lateralmente para formar colônias achatadas, retangulares, do tipo placa contendo por 2, 4, 8, 16 ou, mais raramente, 32 células dispostas lado a lado, com seus eixos mais longos paralelos entre si (**Figura 1.1c**). As células estão comumente dispostas em uma linha, podendo estar uma ao lado da outra em uma só série, mas também podem se apresentar como duas séries em linhas alternadas, formando um zig-zag, com uma célula mais para cima, seguida de outra para baixo. Ocasionalmente, estas células podem ocorrer sozinhas, especialmente quando mantidas em meios de cultivo (Bicudo e Menezes, 2006; Van Vuuren *et al.*, 2006).

As células têm em sua maioria comprimentos de 5-30 μ m com 2-10 μ m de largura, com formatos que variam de elipsóides a ovóides, fusiformes ou lunados (Van Vuuren *et al.*, 2006). Além disto, as células podem ser todas iguais no mesmo cenóbio ou as extremas serem de uma forma e as internas de outra. A parede celular é lisa na maioria das espécies, mas também pode ser ornada com diminutos espinhos, dentes ou uma costela mediana bastante evidente (Bicudo e Menezes, 2006; Van Vuuren *et al.*, 2006).

Há somente um cloroplasto por célula, localizado parietalmente, ocupando toda a superfície interna da célula e um único pirenóide localizado centralmente em cada célula (Bicudo e Menezes, 2006). As paredes celulares são bastante resistentes à degeneração, podendo contribuir para a formação de combustíveis fósseis, bem como para registros fósseis. A reprodução geralmente ocorre com a formação de autósporos, com a formação de uma colônia filha dentro de cada célula e a reprodução sexuada é extremamente rara. As espécies são identificadas pelo número, arranjo, tamanho das células e padrão de ornamentação das paredes celulares, como os espinhos, costelas e granulações, por exemplo (Van Vuuren *et al.*, 2006).

As espécies de *Scenedesmus* que possuem espinhos nas células extremas e ou intermediárias do cenóbio foram transferidas para o gênero *Desmodesmus*. Esta separação em 2 gêneros foi feita utilizando como base uma comparação na sequência do DNA ribossômico ITS-2. Porém ainda é difícil saber ao certo o número de espécies dentro do gênero *Scenedesmus*, acredita-se que sejam entre 40 e 50. A dificuldade em precisar o número de espécies dentro do gênero reside na definição das características que devam ser usadas para a separação das espécies, variedades e formas taxonômicas (Bicudo e Menezes, 2006).

1.3 O FÓSFORO NO METABOLISMO DE MICROALGAS

A composição orgânica da célula inclui principalmente proteínas, lipídeos e carboidratos e esses têm como elementos majoritários carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N). Outros elementos são necessários em uma concentração reduzida, em relação aos primeiros, tais como fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca) e cloro (Cl). Além destes, outros elementos, em quantidades traço, apoiam o metabolismo celular (Si, Fe, Mn, Mo, Cu, Co, Zn, B, Va) (Reynolds, 2006).

Organismos autotróficos requerem nutrientes inorgânicos do meio e muitos destes são retirados mesmo quando em concentrações muito baixas. Assim, estes gastam energia para concentrar os nutrientes nas células e depois transferi-los para o local de deposição ou uso. Alguns tendem a acumulá-los, fazendo com que a composição destes nas células não seja um reflexo da condição do ambiente onde a mesma se encontra (Reynolds, 2006).

O fósforo costuma ser um elemento limitante para o crescimento de microalgas e sua fonte natural na água provém de minerais fosfatados, tais como apatitas cristalinas (fluorapatita e hidroxiapatita). Estas formas de fosfato de cálcio têm baixa solubilidade em águas com pH neutro, o que reduz a biodisponibilidade em águas (Emsley, 1980). Este, normalmente se encontra biologicamente disponível em combinação com o oxigênio, formando íons de ácido ortofosfórico OP (OH)₃ (Emsley, 1980), que é um ácido tribásico fraco e tem seus ânions (PO³⁻4, HPO²⁻4, H₂PO³⁻4) variando conforme o pH. Os radicais hidrogênio podem ser substituídos por metais alcalinos, onde o cálcio, alumínio e ferro, por exemplo, afetariam a biodisponibilidade dos íons ortofosfato, tornando-os biologicamente indisponíveis (Reynolds, 2006).

A pequena quantidade de fósforo biodisponível o torna um elemento limitante para o crescimento do organismo, tamanho da população e distribuição, já que este ânion é essencial para o fitoplâncton funcionalmente ativo, visto que apresenta diversas funções. Estas vão desde componentes estruturais de biomoléculas vitais, como os ácidos nucléicos e adenosina trifosfato (ATP) (Fogg, 1973), que fornece energia para o transporte intracelular. Além disto, participam na composição dos fosfolipídeos, que têm múltiplas funções nas células, como por exemplo, o estabelecimento da barreira de permeabilidade para as células e organelas celulares (Dowhan, 1997), até a participação em importantes eventos biológicos como a modulação enzimática, por fosforilação e desfoforilação e capacidade tamponante (Seufferheld e Curzi, 2010). O conteúdo de fósforo em células em crescimento, repletas de nutrientes, fica em torno de 1-1,2% da biomassa livre de cinzas, com uma proporção de carbono:fósforo de 106:1. Entre as algas de água doce, o conteúdo de fósforo é ainda mais variável, embora as taxas de crescimento máximas sejam conseguidas em células com fósforo equivalente a 1-2% da biomassa seca (Round, 1965).

O fósforo do RNA em organismos fotossintetizantes, bem como outros organismos, é um componente celular importante contendo uma parcela de fósforo não pertencente aos estoques. Enquanto o RNA tem 0,091 g de fósforo por grama de peso seco, valores correspondentes para outros compostos orgânicos são: 0,095 g para DNA, 0,041 g para fosfolipídeos, 0,12 g a 0,23 g para ésteres fosfatados de baixo peso molecular solúveis em água e 0,32 g de fosfato inorgânico (**Tabela 1.1**).

Phosphorus-containing compound	g phosphorus per g dry compounds		
RNA	0.091		
DNA	0.095		
Phospholipid	0.041		
Hexose-1-phosphate or hexose-6-phosphate	0.12		
Fructose-1,6-bisphosphate	0.18		
ATP	0.18		
Ribulose-1,5-bisphosphate	0.20		
2-phosphoglycolate	0.22		
Glycerate-1,3-bisphosphate	0.23		
Inorganic phosphate	0.32		

 Tabela 1.1: Fração de fósforo em compostos fosfatados nas células.

From Geider and La Roche (2002), with additional calculations on low-molecularmass water-soluble phosphate esters and on inorganic phosphate.

Em Raven, 2013

Quando disponível no ambiente, o fósforo pode ser armazenado nas microalgas em um mecanismo conhecido como comportamento de "luxúria", fazendo com que estas tenham em torno de $\geq 3\%$ da massa seca em fósforo, mudando a relação carbono:fósforo para ≤ 40 :1. Assim, as células podem conter de 8 a 16 vezes o requerimento mínimo necessário e, em teoria, são capazes de suportar de 3 a 4 duplicações celulares, sem retirar nenhum fósforo a mais do ambiente (Reynolds, 2006). Entretanto, as divisões celulares cessam quando o conteúdo de fósforo interno é muito baixo para ser dividido entre as células filhas e não pode ser reposto pela retirada do meio. Este conceito de cota celular mínima (Droop, 1973) tem sido utilizado para compreender a dinâmica de limitação de nutrientes e crescimento algal. Para o fitoplâncton, o limite mínimo parece ser reduzido para níveis que variam entre 0,2 - 0,4% da biomassa seca.

O metabolismo relacionado à aquisição, armazenamento, liberação e integração metabólica do fosfato inorgânico está relacionado com diversas enzimas, como por exemplo, as fosfatases extracelulares ácidas e alcalinas, fosfodiesterases, transportadores de fosfato, polifosfato quinases e endopolifosfatases (Persson *et al.*, 2003). Alguns genes, conhecidos por estarem na via Pho, responsável pela ativação de genes necessários para aquisição e percepção do fosfato, são ativados quando o meio apresenta baixas concentrações de ortofosfato, por exemplo.

A ausência de fosfato nas células de *E. coli* são detectadas por *PhoR*, que leva a ativação do principal regulador de fosfato, o *PhoB*. Este ativa mais de 30 genes, incluindo *PhoA*, que codifica a fosfatase alcalina. Tem sido reportado que baixas concentrações de fosfato no meio de crescimento são requeridos para a ativação de genes que levam ao acúmulo de polifosfato. Em *E. coli*, por exemplo, dois componentes do sistema regulatório *PhoR±PhoB* controlam o regulador *Pho*, que consiste de mais de 30 genes (Van Bogelen *et al.*, 1996) que são induzidos ou reprimidos na ausência de fosfato. Alguns destes genes estão envolvidos no transporte e assimilação de fosfato inorgânico e componentes contendo fósforo.

Algumas bactérias de vida livre, de solo, desenvolveram mecanismos para utilizar menos fósforo nos seus constituintes celulares e sob condições de fosfato limitante, alteram a composição da sua parede celular de forma que o componente ácido tecóico, rico em fósforo, é reposto por outro ácido, livre de fósforo, como em *Bacillus subtilis* (Merad *et al.*, 1989). Além disto, já foi verificado em diversas bactérias, que os fosfolipídeos de membrana são repostos por lipídeos sem fósforo (Minnikin *et al.*, 1972; Minnikin *et al.*, 1974; Minnikin and Abdolrahimzadeh, 1974; Benning *et al.*, 1995). Em 1999, Geiger e colaboradores mostraram que sob condições de estresse de fosfato, a bactéria *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* produz lipídeos sem fósforo: lipídeos ornitina, sulfoquinovosil diacilglicerol, e trimetil homoserina diacilglicerol.

Em microalgas muitos mecanismos ainda precisam ser elucidados para esclarecer a relação entre o estoque de fósforo em corpos de polifosfato, tidos como

possível reserva energética e reguladores de condições de estresse (Achbergerová e Nahalká, 2011), bem como o comportamento da degradação dos corpos de polifosfato em condições controle e de estresse nutricional por ausência de fósforo e sua a relação com o aumento no acúmulo de lipídeos.

1.4 ESTOQUE DE FÓSFORO EM GRÂNULOS DE POLIFOSFATO

O fósforo acumulado na microalga é encontrado sob a forma de grânulos de polifosfato (PoliP). Estes são polímeros lineares que contém dezenas a centenas de resíduos de ortofosfato ligados por ligações fosfoanidras ricas em energia, semelhantes às observadas na molécula de ATP (**Figura 1.2**). Quando estas ligações químicas são desfeitas, a energia potencial presente é liberada e usada em reações biológicas. Desta forma, o polifosfato parece ser uma forma de estoque de energia antiga e fácil de ser encontrado desde os tempos pré-bióticos até hoje. Este pode ser formado através da condensação enzimática de ortofosfato por quinases (Kornberg, 2008) ou pela desidratação do ortofosfato em elevadas temperaturas como regiões próximas a vulcões (Yamagata *et al*, 1991).



Figura. 1.2: A molécula de polifosfato (Imagem de Achbergerová e Nahalká, 2011).

Segundo a teoria de Kornberg (2008), o polifosfato representa um fóssil bioenergético e as enzimas de síntese e degradação do polifosfato, as polifosfato quinases (PPKs) estão amplamente distribuídas em microrganismos, onde todos os tipos celulares descritos na natureza têm polifosfatos. Ele já foi encontrado em todos os tipos de células tendo sido descritos em bactérias, arqueobactérias, fungos, plantas, protozoários e células animais . Além disto, já foi demonstrado que os polifosfatos podem estar ligados a íons como cálcio, magnésio e manganês (Docampo e Moreno, 2011).

O polifosfato pode ser classificado como de cadeia curta ou longa, dependendo do tamanho da cadeia de polifosfato. Em procariotos, as enzimas que sintetizam o PoliP primário seriam as polifosfato quinases 1 e 2 (PPK1 e PPK2, respectivamente), que catalizam a seguinte conversão de PoliP a ATP:

$nATP \leftarrow \rightarrow poliPn + nADP$

A enzima PPK purificada de *E. coli* catalisa a conversão reversível do fosfato terminal do ATP a poliP. Esta enzima é um tetrâmero de 80 subunidades que se encontra ligado às membranas celulares e é responsável pela síntese do poliP de cadeias longas (750 resíduos) *in vivo*. Com o ADP em excesso, a PPK converte aproximadamente 90% do poliP a ATP (Kornberg, 1995).

A síntese do polifosfato em *E. coli* ocorre após a fosforilação da enzima PPK e o processo ocorre em uma região da enzima semelhante à um túnel, cuja sequência é altamente conservada. Esta contém um sítio hidrofóbico que acomoda uma molécula de ATP e os três fosfatos são coordenados por íons magnésio, enquanto o outro lado do túnel contém os resíduos positivamente carregados que interagem com as cadeias de polifosfato durante o alongamento.

Dentre as enzimas de degradação encontradas, a exopolifosfatase (PPX), catalisadora da clivagem do ortofosfato, é a mais importante (Kuluaev *et al.*, 2005; Brown e Kornberg, 2008). A PPX encontrada em *E. coli* hidrolisa o resíduo terminal de PoliP a fosfato inorgânico (Pi), com forte preferência por substratos de cadeia longa (Kornberg, 1995).

Os polifosfatos foram primeiro descritos em uma bactéria (*Spirilum volutans*) como corpos de volutina, que há mais de 100 anos foram chamados de grânulos de volutina por Meyer (1904), pois coravam de rosa com o marcador azul de toluidina. Estes foram renomeados para grânulos de polifosfato quando foi verificado que o seu componente principal eram polímeros de fosfatos. Também são designados de acidocalcissomos em protozoários, devido ao seu caráter acídico e por conterem cálcio. Estes são armazenados e observados por microscopia eletrônica de transmissão como grânulos elétron densos (Kornberg *et al.*, 1999; Seufferheld e Curzi, 2010).

Estes grânulos têm numerosas funções, dependendo de onde estejam e quando eles são necessários (Kornberg *et al.*, 1999). A maior parte do conhecimento das funções do polifosfato vem do mundo microbiano e já foi verificado que este pode influenciar a transcrição de genes específicos, agir como um regulador metabólico, fornecer uma fonte de energia alternativa e modular diversas respostas ao estresse

(Seufferheld e Curzi, 2010). Também possuem funções como sequestro e armazenamento de cátions, transporte de fosfato, formação de envelope celular, controle de expressão gênica, regulação da atividade enzimática, adaptação ao estresse e ainda como fonte de energia alternativa (Kornberg *et al.*, 1999; Boyce *et al.*, 2006).

Além disto, o polifosfato já foi reportado como importante para os microrganismos em condições extremas de salinidade, osmolaridade, desidratação radiação UV, pressão barométrica, pH e temperatura. Estas adaptações podem ter sido importantes para os primeiros organismos vivendo nas condições da Terra primitiva. Um exemplo disto é que organismos mutantes nas enzimas *ppk1*, que não tinham polifosfato, eram mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio, altas temperaturas e salinidade quando comparados aos não mutantes.

Existem evidências de que o polifosfato pode também representar um reservatório osmoticamente ativo e um estoque de ferro, elemento que pode ser um fator limitante na proliferação de algas (Ruiz *et al.*, 2001b; Seufferheld e Curzi, 2010). Estoques de polifosfato já foram designados como importantes para a resistência a metais pesados em muitos eucariotos e procariotos (Hashemi *et al.*, 1994; Nagasaka e Yoshimura, 2008).

Sabe-se que algumas microalgas acumulam fosfato em corpos de polifosfato, como por exemplo, as clorofíceas *Ankistrodesmus braunii*, *Chlorella vulgaris* (Kuluaev *et al.*, 2004), *Chlamydomonas reinhardtii*, (Ruiz *et al.*, 2001b), *Scenedesmus obliquus* e *S. quadricauda* (Kuluaev *et al.*, 2004). Nas algas, bem como em outros organismos, o conteúdo de PoliP depende do estágio de crescimento, sendo o menor conteúdo encontrado durante a fase exponencial e o maior em culturas mais antigas (Smillie e Krotokov, 1960).

Cultivos da cianobactéria *Plectonema boryanum* em meios reduzidos ou livres de fosfato apresentaram uma diminuição nos polifosfatos de cadeia curta e longa. Citologicamente, a ausência de fosfato foi caracterizada pelo aparecimento de áreas de densidade média e vacuolização resultante da expansão dos espaços intratilacoidais. O re-inóculo de fosfato no meio de cultura onde as algas haviam sido submetidas previamente à ausência deste levou a um aumento em todas as frações contendo fosfato, particularmente os polifosfatos, tendo a reposição ocorrido no período de uma hora. Análises por energia dispersiva de raios-x confirmaram que os depósitos consistiam de dois maiores elementos, fósforo e cálcio (Jensen e Sicko-Goad, 1976).

Os acidocalcissomos têm sido mostrados em associação às organelas subcelulares, tais como o vacúolo contrátil, cloroplasto e núcleo em *C. reinhardtii* (Ruiz *et al.*, 2001 b; Kuluaev *et al.*, 2004). Estas observações fazem surgir novas dúvidas sobre a função do polifosfato na fisiologia celular e metabolismo, sendo de grande relevância o estudo do polifosfato para compreender melhor as suas funções na célula.

Dois trabalhos de Kornberg e colaboradores (Rao e Kornberg,1996; Kornberg *et al.*, 1999) relatam que os polifosfatos em bactérias estão diretamente relacionados à ativação de genes que levam a uma parada na fase logarítmica de crescimento e a uma ativação do programa de sobrevivência celular, levando à fase estacionária. Provavelmente, a função mais importante dos PoliPs nos microrganismos – procariotos e eucariotos inferiores, que dependem muito das variações das condições ambientais – é a reserva de fosfato e energia.

Reusch forneceu novas idéias de funções dos PoliPs ao mostrar o envolvimento destes na formação de canais através das membranas celulares, juntamente com o poli- β -hidroxibutirato e o cálcio (Reusch, 1992, 2000). Além disso, a descoberta de diferentes grupos de enzimas do metabolismo de polifosfato em diferentes organelas de células eucarióticas permitiu considerar diferentes funções fisiológicas do poliP em diversos compartimentos de células eucarióticas (Lichko *et al.*, 2003a). A análise do polifosfato revelou a presença de bombas de cálcio e próton, próton pirofosfatase tipo vacuolar (V-H⁺-PPase), uma ATPase tipo vacuolar (V-ATPase) e dos trocadores Na⁺/H⁺ e Ca²⁺/H⁺ nestes compartimentos. Na **Figura 1.3** é possível visualizar uma representação esquemática de um acidocalcissomo (ou polifosfato) com as suas bombas, transportadores e canais.

Os grânulos podem conter longas cadeias de polifosfato insolúveis, que estão presentes no citoplasma de vários procariotos ou podem estar presentes sob a forma de cadeias curtas, como em algumas bactérias, estando localizados na superfície da célula, no periplasma e na membrana plasmática. Em *Neisseria* estes foram encontrados formando coberturas do tipo cápsula ligados à membrana da superfície da célula e em *Helicobacter pylori* estes foram encontrados no citoplasma em associação com a membrana da célula, onde partículas compactas foram visualizadas no pólo flagelar.

Compreender o comportamento destes grânulos ricos em fosfato, sua localização e função nos diferentes organismos pode esclarecer alguns pontos como a relação entre a redução de fósforo no meio e o aumento na síntese lipídica. Considerar que estes corpos de polifosfato são sintetizados para estoque de energia e fosfato, que sua degradação pode produzir ATP e que a energia liberada destes carreadores energéticos é usada pela célula para a produção de moléculas vitais, tais como lipídeos, pode auxiliar no esclarecimento da fisiologia de alguns organismos.



Figura 1.3: Representação esquemática de um acidocalcissomo (Imagem de Docampo e Moreno, 2011).

1.5 ACÚMULO E FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS

Os corpos lipídicos são organelas que estocam lipídeos neutros em seu centro, especialmente triacilgliceróis (TAG) e ésteres colesterol (éster esterol em leveduras e *Drosophila*) (Murphy e Vance, 1999). Eles estão presentes em todas as células eucarióticas e algumas procarióticas, são envolvidos por uma monocamada de lipídeos polares (Tauchi-Sato *et al.*, 2002), com proteínas associadas e apresentam estruturas lamelares arranjadas concentricamente (Robenek *et al.*, 2004). Algumas das suas funções conhecidas são estocar e fornecer lipídeos para o metabolismo energético, síntese de membranas e a produção de moléculas essenciais derivadas de lipídeos.

Na via convencional de biossíntese de TAG, amplamente aceita para leveduras, plantas e mamíferos, este é produzido no retículo endoplasmático (RE), a partir do seu precursor imediato, o diacilglicerol (DAG), por aciltransferases específicas do RE e é depositado em corpos lipídicos no citosol. Estes se formam a partir do brotamento no RE, onde moléculas de gordura acumulam entre as monocamadas do RE e induzem uma deformação da membrana, em um processo que envolve a nucleação, crescimento e brotamento (Thiam e Fôret, 2016). Murphy e Vance (1999) revisaram algumas informações sobre os sítios de formação, alvos finais e proteínas majoritárias associadas, que são mostradas na **Tabela 1.2**, porém ainda existe a necessidade de mais estudos, considerando as peculiaridades de cada tipo celular.

Tissue/cell type	Site of formation	Targeting	Major associated protein(s)	
Plants				
Seeds and fruits	ER	Cytosol	Oleosin ^a	
Anther - pollen	ER	Cytosol	None	
Anther - tapetum	ER	Release via cell lysis	Oleosin-like	
Plastids	Envelope membrane	Stroma	Fibrillin/PLP	
Animals				
Liver – hepatocytes, intestine – enterocytes	ER	Secretion via ER–Golgi	Apolipoprotein	
Adipose - adipocytes	ER	Cytosol	Perilipin/ADRP	
Adrenal, testis, ovary (steroidogenic)	ER	Cytosol	Perilipin/ADRP	
Mammary - epithelium	ER?	Secretion via exocytosis	(i) ADRP, (ii) butyrophilin ^b	
Others – e.g. leukocytes	ER?	Cytosol	ADRP?	
Microorganisms				
Yeast	ER	Cvtosol	?	
Polyhydroxyalkanoate- accumulating prokaryotes	Plasma membrane	Cytosol	Phasin	
Streptomyces spp	Plasma membrane	Cytosol	?	

Tabela 1.2: Formação de corpos lipídicos em diferentes tipos celulares:

Adaptado de Murphy e Vance, 1999.

Fan e colaboradores, em 2011, observaram que a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* utiliza uma via de biossíntese de TAG distinta, no qual o DAG é derivado quase que exclusivamente dos cloroplastos, produzido por aciltransferases exclusivas do cloroplasto. Esta via de biossíntese de TAG depende principalmente da síntese de ácido graxo "*de novo*" e o TAG formado se acumula em gotas lipídicas no cloroplasto e citoplasma. As vias bioquímicas, enzimas e fatores que regulam o acúmulo de TAG em microalgas ainda são pouco definidas. Neste trabalho de 2011 foram apresentadas evidências bioquímicas e ultraestruturais de que *C. reinhardtii* emprega uma via do cloroplasto para a síntese "de novo" de TAG, apoiando que seu precursor imediato é DAG.

Apesar de saber que muitas microalgas acumulam TAG sob condições de limitação de N, P ou em resposta a altas salinidades, a origem biossintética do TAG em microalgas não está clara.
1.6 O USO POTENCIAL DOS LIPÍDEOS DE MICROALGAS COMO BIOCOMBUSTÍVEIS

Microalgas têm sido estudadas para a produção de combustíveis, bem como para a produção de diferentes componentes tais como polissacarídeos, lipídeos, proteínas, pigmentos (exemplo carotenoides), vitaminas, enzimas, antibióticos, produtos farmacêuticos, entre diversos outros. Diversas pesquisas foram desenvolvidas para demonstrar que a biomassa algal poderia ser utilizada em aplicações na indústria de alimentos, por apresentarem proteínas e lipídeos de alto valor nutricional, no fornecimento de vitaminas B12 e E, carotenóides precursores da vitamina A, na alimentação animal com uso na ração de peixes na aquicultura, biofertilizantes, condicionadores de solo e purificadores biológicos para águas poluídas utilizadas pela população (Brennan e Owende, 2010; Borowitzka e Borowitzka, 1988).

A aplicação das microalgas na produção de biodiesel deriva da sua capacidade de acumular ácidos graxos, especialmente os triacilgliceróis. Este acúmulo de lipídeos ocorre, principalmente, quando estas são mantidas sob condições de estresse luminoso ou nutricional, causados, por exemplo, pela redução de nitrogênio e fósforo no meio. Alguns autores relatam que o conteúdo lipídico pode chegar a 80% do peso seco da microalga, sendo mais comum que atinjam entre 20 e 50% (Chisti, 2007).

O preço do óleo de microalgas ainda não é competitivo com o do petróleo, mas existem fatores positivos tais como reaproveitamento da água, a possibilidade de cultivo sobre espaços de terras que não competem com a agricultura, uso da energia solar para crescimento da biomassa, consumo de CO₂ e liberação de oxigênio, e a necessidade de combustíveis renováveis e ambientalmente limpos têm estimulado mais pesquisas e financiamentos sobre estes organismos (Chisti, 2007; Greenwell *et al.*, 2010). Porém, alguns fatores ainda têm sido limitantes, tais como: condições de cultivo que forneçam maiores quantidades de lipídeos, matérias-primas mais baratas para a construção dos sistemas de cultivo, maior aproveitamento da luminosidade, controle da temperatura, redução da energia gasta com agitação do meio e retirada da biomassa do meio, extração de lipídeos, além da seleção de linhagens que acumulem grandes quantidades de lipídeos e compreensão da fisiologia e dos principais mecanismos que ativam a biossíntese de lipídeos das microalgas.

Para substituir os combustíveis de origem fóssil, estes organismos devem apresentar benefícios ambientais, ser capazes de atender a demanda com quantidades suficientes, mas principalmente deve ser economicamente viável (Meng *et al.*, 2009).

Cultivos abertos são mais baratos, porém apresentam grandes taxas de contaminação, o que pode reduzir a produtividade. Os fotobiorreatores ou sistemas fechados estéreis são mais caros, pois devem ser de material resistente ao sol e calor, ser vedado para manter a esterilidade e são difíceis de desenvolver, pois há necessidade de se verificar qual é a posição que favorece um maior aproveitamento da entrada de luz, como produzir grandes volumes de cultivo ocupando pequenos espaços e a melhor maneira de manter as células em constante agitação com menor gasto de energia elétrica (Harun *et al.*, 2010).

1.7 LIPÍDEOS DE MICROALGAS E BIODIESEL

Nos organismos oleaginosos usados para a produção de biocombustíveis podemos encontrar lipídeos polares e neutros. Os lipídeos polares incluem fosfolipídeos, tais como fosfatidilinositol, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, e glicolipídeos, e os lipídeos neutros incluem (mono, di e triglicerídeos), ceras e lipídeos tipo isoprenóides (exemplo os carotenóides) (Christie, 2003).

As microalgas, mantidas sob condições ótimas de cultivo, sintetizam ácidos graxos para a formação dos lipídeos polares, sendo estes os lipídeos estruturais ou os que participam da formação das membranas celulares, como as membranas dos tilacóides (eles variam de 5 a 20% do seu peso seco). Já o segundo grupo corresponde aos lipídeos de estoque, perfazendo a reserva energética de muitos organismos (Greenweel *et al.*, 2010).

Quando mantidas sob condições ambientais desfavoráveis ou condições de estresse, muitas algas alteram sua via de biossíntese de lipídeos para a formação e acúmulo de lipídeos neutros (20-50% do seu peso seco), principalmente sob a forma de triacilglicerol (TAG).

O acúmulo de lipídeos se inicia com a exaustão de nutrientes do meio, mas um excesso de carbono da fotossíntese continua sendo assimilado pelas células e é convertido a TAG (Meng *et al.*, 2009). Estes TAGs são depositados em corpos lipídicos localizados no citoplasma, embora a formação e o acúmulo dos corpos lipídicos possam ocorrer no espaço inter-tilacoidal dos cloroplastos de algumas clorofíceas (Hu *et al.*, 2008b). Na célula, os triglicerídeos podem servir como uma remoção dos ácidos graxos livres, retirando estes do citoplasma e evitando, então a lipotoxicidade (Kurat *et al.*, 2006).

Tem sido verificado que várias microalgas acumulam lipídeos neutros, similares aos encontrados nos óleos vegetais usados para biodiesel, sendo principalmente encontrados os triacilgliceróis ou triglicerídeos (> 80%), com um perfil de lipídeos rico em C16 e C18 (Meng *et al.*, 2009). Esses lipídeos são de interesse na produção de biocombustíveis e podem ser utilizados como matéria-prima na produção de biodiesel.

Os TAGs podem ser convertidos a ésteres metilados, que são o biodiesel, através da reação de transesterificação. Nesta reação, os triglicerídeos reagem com um álcool, que pode ser o metanol (ou o etanol) e geram o glicerol e os ésteres metilados. A reação ocorre na presença de um catalisador, como o hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio (Greenwell *et al.*, 2010; Chisti *et al.*, 2007) (**Figura 1.4**).



Figura 1.4: Reação de transesterificação do óleo a biodiesel. R1-3 são grupos de hidrocarbonetos (Chisti *et al.*, 2007).

Para a produção de biodiesel, somente os microrganismos que acumulam altos teores de ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1) e em menores proporções o ácido palmítico (C16:0) são potenciais alvos, pois eles mimetizam óleos de maior valor, melhoram a estabilidade oxidativa e tem maior potencial para a produção industrial de biodiesel (Meng *et al.*, 2009). Entretanto, algumas microalgas apresentam ácidos graxos polinsaturados, que não são desejados nesses óleos, visto que eles reduzem as taxas de esterificação e podem afetar a eficiência da síntese do biodiesel, além de influenciar nas propriedades dos combustíveis, como por exemplo, fornecer baixa estabilidade oxidativa (Singh *et al.*, 2011; Greenwell *et al.*, 2010).

A composição relativa de lipídeos nas algas irá variar conforme o crescimento celular (idade celular), a limitação de nutrientes fundamentais como fósforo, nitrogênio e sílica, intensidade luminosa, temperatura, pH e ciclos de luz e escuro, crescimento auto ou heterotrófico (Shifrin e Chisholm, 1981; Cho e Thompson, 1986; Sukenik e Carmeli, 1990; Ekman *et al.*, 2007).

Um exemplo de estudo com a redução do nitrogênio no cultivo e o uso de cepa geneticamente modificada foi realizado com a clorofícea *Chlamydomonas reinhardtii*. Com o intuito de verificar se a síntese de amido, componente de reserva encontrada em algumas microalgas, competia com a síntese de óleo, modelos mutantes foram estudados sob condições de estresse de nitrogênio. Se tal competição ocorresse, o mutante com a via de síntese de amido bloqueada deveria apresentar um aumento no acúmulo de lipídeos. Entretanto, nenhum aumento significativo foi observado nas cepas mutantes. Além disto, foi verificado que a deficiência de nitrogênio induziu a produção de TAGs ricos em ácidos palmítico, oléico e linoléico e uma redução de 80% nas membranas dos plastídeos, causando redução nas membranas tilacóides (Siaut *et al.*, 2011).

Outro estudo utilizou a diatomácea *Dunaliella salina* mantida em altas intensidades luminosas e variou as concentrações de nitrogênio para que fosse atingido um estresse nutricional. Elas chegaram a alcançar 44% do seu peso seco em lipídeos, quando sob condições reduzidas de nitrogênio (2 mM NO₃) e 38% quando mantida em condições elevadas de nitrogênio (20 mM NO₃).

Estudos realizados com a clorofícea *Ankistrodesmus* (cepa ANRF-01) submetida à redução de fosfato 10 e 50 vezes no meio demonstraram que a maior síntese de lipídeos foi alcançada ao submeter à microalga a uma maior redução de fósforo (50 vezes) no meio de cultivo (Santos, 2011).

Ao submeter esta mesma linhagem a variações nas intensidades luminosas do cultivo (900, 1400 e 2000 μ mols de fótons. m². s⁻¹), esta demonstrou ter um maior percentual lipídico na maior intensidade luminosa, atingindo 46±7,3% de peso seco da biomassa, enquanto que foram alcançados 40±4% e 33±7,8% de peso seco de lipídeos com as intensidade de 900 e 1400 μ mols fótons. m⁻². s⁻¹. Entretanto, os maiores rendimentos de ésteres metilados de ácidos graxos (68±20,5%) foram obtidos em 1400 μ mols de fótons. m². s⁻¹, enquanto em 900 e 2000 μ mols fótons.m⁻².s⁻¹ foram obtidos 37±4,4 e 33±5,7%, respectivamente (Miranda, 2011).

O acúmulo de lipídeos pode ser espécie-específico e muitas vezes linhagemespecífico. Microalgas de um mesmo gênero podem apresentar grandes variações na porcentagem de lipídeos por peso seco, como por exemplo, as do gênero *Scenedesmus*, onde *S. obliquus* pode atingir de 12 a 14%, *S. quadricauda* 1.9% e *S. dimorphous* de 16 a 40% (Bruton *et al.*, 2009). Análises da composição lipídica das algas utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) e Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF) mostraram uma ampla variedade de classes de lipídeos: glicerolipídeos, tais como mono e digalactosildiacilglicerol (MGDG e DGDG); fosfolipídeos, tais como a fosfatidilcolina (PC); e lipídeos neutros como triacilgliceróis (TAG). Muitas análises eram direcionadas aos lipídeos polares, entretanto as análises de triacilgliceróis tem se tornado crescentemente importantes para aplicações em biocombustíveis. Amostras mistas de TAG continuam sendo um desafio devido à sua baixa eficiência de ionização relativa aos lipídeos polares, como os fosfolipídeos. Análises de lipídeos neutros em microalgas geralmente são realizadas baseadas em ensaios de fluorescência lipofílica e colorimétricos, entretanto estes não são capazes de fornecer a caracterização da composição destes (Danielewicz *et al.*, 2011).

A análise da composição dos TAGs de microalgas envolve a separação inicial do extrato usando tanto a cromatografia líquida ou cromatografia em camada delgada seguida por análises de espectrometria de massas ou derivatização dos extratos, tais como transesterificação, seguida pelas análises dos ésteres metilados de ácidos graxos (FAME) por GC-MS. A análise direta dos TAGs tem sido reportada como alternativa promissora, mas requer equipamentos especiais e o uso de elevadas temperaturas, o que pode limitar o uso deste método (Danielewicz *et al.*, 2011).

Como os lipídeos representam uma alta diversidade de moléculas, existe um grande número de vias metabólicas envolvidas em sua biossíntese. Nas microalgas, os ácidos graxos produzidos são incorporados em componentes lipídicos tanto no cloroplasto, quanto no RE (Riekhof *et al.*, 2005). Estas vias usam o glicerol 3 fosfato como base para a adição seqüencial de ácidos graxos suplementada pela acetil-CoA. A origem e destino da acetil-CoA para esta reação é um importante ponto de regulação desta parte da via de síntese lipídica. Acetil-CoA pode ser originária da glicólise citosólica ou plastidial, ou diretamente da dihidroxiacetona fosfato do ciclo de Calvin na luz. Outra via metabólica para o acúmulo de lipídeos na célula ocorre através da reciclagem de ácidos graxos existentes de outros componentes celulares, como por exemplo, as membranas.

A decisão se os lipídeos serão sintetizados de carbonos recém assimilados ou de carbonos reciclados é dependente do estado metabólico das células. Nas células em crescimento acelerado, o metabolismo lipídico está principalmente voltado para a biossíntese de lipídeos de membrana para apoiar o desenvolvimento das membranas que estão sendo ampliadas. A maioria dos lipídeos nestas células é sintetizada via "*de novo*". Por exemplo, sob condições de estresse, pouco mais da metade dos novos lipídeos se originam da síntese de ácidos graxos "*de novo*", enquanto que o resto dos lipídeos acumulados resultam da reciclagem dos ácidos graxos existentes (da célula ou das membranas) (Roessler, 1988; Kurat *et al.*, 2006).

De maneira geral, o metabolismo de triglicerídeos é complexo e regulado em diversos níveis, baseados nos sinais nutricionais e ambientais. Por exemplo, a atividade de acil hidrolases específicas de lipídeos de membrana (galactolipídeos) foi aumentada em células de *D. salina* mantidas sob deficiência de nitrogênio (Cho e Thompson, 1986). Os autores sugerem a subseqüente importação dos ácidos graxos em triglicerídeos. Uma via bioquímica similar foi descrita em leveduras, nos quais lipases que degradam triacilgliceróis foram regulados negativamente após ausência de nutrientes, sugerindo que os ácidos graxos são preferencialmente retidos e acumulados como triacilgliceróis, somente para uma rápida mobilização como saída para a falta de nutrientes (Kurat *et al.*, 2006). Existem poucos dados sobre o controle e regulação deste redirecionamento metabólico de lipídeos, entretanto modulações de genes podem ser realizadas para permitir esta investigação.

Trabalhos com a microalga clorofícea *Chlorella* demonstraram que dois genes de enzimas dessaturases, que convertem C18:1 em 18:2 (enzima CvFAD2) e C18:2 em C18:3 (enzima CvFAD3) são ativados em temperaturas baixas. A enzima CvFAD2 apresentou 66% de homologia com dessaturases de vegetais superiores e ao serem expressos na levedura *Saccharomyces cerevisae* foi verificado um acúmulo de C18:2. Isto indica que a identificação e caracterização de enzimas envolvidas com a biossíntese e conversão de ácidos graxos podem ter um importante significado biotecnológico para favorecer o acúmulo de lipídeos de interesse para biocombustíveis.

Um dos maiores desafios relacionados à pesquisa de biocombustíveis de algas será a identificação de espécies com atributos ótimos, que combinem altas taxas de crescimento, alto conteúdo de lipídeos, facilidade de retirar as células do cultivo e de extrair os lipídeos. Parte da busca por espécies ótimas será baseada no conteúdo lipídico e na composição e perfil dos ácidos graxos (Greenwell *et al.*, 2010).

Para alcançar custos reduzidos na produção, estudos em diversas áreas ainda são necessários, além da compreensão de características morfológicas e aspectos fisiológicos destes organismos. Desta forma, este trabalho visa compreender aspectos morfológicos e fisiológicos de linhagens de microalgas clorofíceas, buscando maior compreensão do metabolismo de acúmulo de lipídeos de interesse na produção de biodiesel quando estas são mantidas sob condição de privação de fosfato.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é selecionar, caracterizar e avaliar uma linhagem de microalga clorofícea, cultivada sob diferentes concentrações de fosfato no meio, visando o acúmulo de lipídeos de interesse biotecnológico.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho incluem:

• Selecionar uma linhagem dentre as microalgas clorofíceas dos gêneros *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium* e *Scenedesmus*, escolhendo aquela que possua maior acúmulo lipídico e grânulos de polifosfato em seu conteúdo intracelular, bem como caracterizar sua morfologia;

 Verificar os efeitos da ausência de fosfato na microalga selecionada, avaliando parâmetros como crescimento, volume médio, concentração de clorofila, taxa fotossintética e potenciais variações no consumo do fosfato dissolvido e dos grânulos de polifosfato;

 Analisar os grânulos de polifosfato na microalga selecionada cultivada sob diferentes concentrações de fosfato no meio, bem como avaliar sua composição e características morfológicas;

• Verificar se existe relação entre os grânulos de polifosfato intracelulares e a presença de lipídeos;

• Identificar os principais ácidos graxos acumulados intracelularmente na microalga selecionada e verificar se estes são de interesse para produção de biocombustíveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO E ESCOLHA DA LINHAGEM DE TRABALHO

Linhagens das microalgas clorofíceas de água doce, isoladas de ambientes brasileiros, pertencentes aos gêneros *Ankistrodesmus* (cepa ANRF-01), *Monoraphidium* (cepa MORF-01) e *Scenedesmus* (cepa SCLJ-01) foram cultivadas no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em meio ASM-1 (Gorham, 1964), que contém 2,4 mg de fósforo por litro. Os cultivos foram mantidos em fotoperíodo de 12 horas, com intensidade luminosa de 300 µmol de fótons.m².s⁻¹, a 24 °C (±2 °C), em frascos de *erlenmeyers* de dois litros, com um volume de 1,5 litro de cultivo. Todos os experimentos foram realizados com três réplicas biológicas para cada condição, exceto no experimento piloto.

O experimento piloto teve como objetivo determinar a linhagem de trabalho, considerando que esta seria escolhida pelo critério de maior acúmulo intracelular de lipídeos neutros. Neste piloto, as três linhagens de microalgas dos gêneros acima mencionados foram cultivadas por 15 dias, tendo como inóculo cultivos com 17 dias. Foram realizadas amostragens com 3, 7, 11 e 15 dias de cultivo para avaliar o acúmulo lipídico. Além disto, o inóculo destes cultivos também foi utilizado para avaliar a presença de grânulos de polifosfato.

Após o teste piloto para determinar a linhagem de trabalho com maior acúmulo de lipídeos, a linhagem da microalga do gênero *Ankistrodesmus* foi utilizada em experimentos com e sem aeração no meio de cultivo para verificar a melhor condição de cultivo. Os cultivos com aeração foram mantidos com sistema de injeção de ar comprimido constante durante todo o experimento, sendo injetado diretamente no meio líquido através de cânula de vidro. Considerando o crescimento mais rápido, a condição com aeração foi determinada como padrão para os experimentos seguintes.

A linhagem selecionada de *Ankistrodesmus* foi cultivada na condição *Com fosfato* (condição controle, utilizando-se o meio ASM-1 padrão) e na condição *Sem fosfato* (tratamento), sendo ambas mantidas sob aeração. Na condição *Sem fosfato*, as células foram cultivadas em meio ASM-1, e os sais contendo fósforo: fosfato de potássio (KH₂PO₄) e fosfato de sódio (Na₂HPO₄) foram omitidos do preparo do meio. Considerando que a remoção desses poderia alterar a proporção dos elementos sódio e potássio, as concentrações desses cátions foram calculadas e repostas sob a forma de KOH e NaOH, garantindo assim, apenas uma variação do elemento fósforo. Todos os meios de cultivo tiveram o pH ajustado para 8,0 antes da esterilização do material.

Após 16 dias de cultivo, as três réplicas das culturas Sem fosfato foram divididas em dois frascos cada réplica. Cada novo frasco, originado da condição Sem fosfato, recebeu a concentração de fosfato semelhante à fornecida na condição controle (Com fosfato) no início do cultivo. Para isto, o volume de cultivo da condição Sem fosfato foi dividido em dois e este foi utilizado para que os cálculos de diluição da solução estoque contendo fosfato atingissem os valores de 2,15 mg de fosfato por litro. Todo o material utilizado nestas transferências foi autoclavado, inclusive a solução contendo fosfato, e as transferências foram realizadas em fluxo laminar. Estas pseudo-réplicas serão chamadas de Fosfato adicionado. As amostragens foram realizadas em tubos Falcon de 50 mL estéreis para a contagem de células, biovolume, volume celular médio, consumo de fosfato dissolvido, concentração de clorofila e atividade fotossintética no momento do inóculo e nos dias 03, 06, 09, 12, 16, 19 e 22. A identificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa, a detecção dos corpos lipídicos por espectrofluorimetria e microscopia de fluorescência foram realizadas com alíquotas amostradas nos dias 0, 8, 16, 20, 23 e 26. Já as observações por microscopia eletrônica de transmissão (com as técnicas de contrastação em bloco e ósmio-imidazol) foram realizadas com amostras coletadas nos dias 8 e 23.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DA CEPA DE ANKISTRODESMUS

A microalga utilizada neste trabalho apresentava identificação morfológica a nível de gênero, entretanto para determinar sua espécie, foram feitas análises moleculares em células retiradas dos cultivos de *Ankistrodesmus* em fase estacionária de de crescimento. O DNA genômico foi extraído de 2-5 mL de culturas e a extração foi realizada com o *NucleoSpinPlant II (Macherey-Nagel)*, segundo as instruções do fabricante. A amplificação do DNA foi realizada pela técnica de PCR para a subunidade maior (LSU) do ribossomo, domínios D1 e D3 do rDNA.

O processo de amplificação foi realizado com volume final de 25 µl de solução contendo: 1U - GoTaq® DNA polimerase (Promega), 1x tampão GoTaq® Flexi (Promega), 1,25 mM de solução de MgCl₂ (Promega), 0,16 mM dNTP's (ThermoScientific Inc., USA), 8 pmol de cada primer, 0,2 µg de Albumina Bovina (BSA) (New England Biolabs Inc,) e cerca de 15 ng DNA genômico. Foram utilizados

os primers D1R (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3') e D3F (5'-ACGAAGGATTTGCACGTCAG-3').

A amplificação seguiu o procedimento: desnaturação inicial de 5 minutos à 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C, extensão de 1 minuto a 72 °C, e por fim, após os ciclos houve mais uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. A verificação dos produtos da PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (1%). Os produtos de PCR (4 μ L) foram misturadas com 1 μ l de tampão (ABF e XC) e 0,5 μ L de gel Red (diluído 500x), em seguida a mistura foi aplicada nos géis. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 90 V em tampão TBE 1x (89 mM de Trisbase, 2,5mM de EDTA, 89 mM de H₃BO₃) pelo período de 50 min e posteriormente fotografados sob luz U.V. A purificação e o sequenciamento dos produtos amplificados foram realizados na empresa Macrogen Inc. (www.macrogen.com) utilizando os mesmos primers da PCR.

As árvores filogenéticas foram geradas com as sequências obtidas neste estudo e outras sequências de Chlorophyceae disponíveis no *GenBank* (NCBI, 2009). Como "*outgroup*" foi utilizada a sequência de *Prototheca stagnora* obtida também no *GenBank*. Todas as sequências foram alinhadas com a versão *online* do *software MAFFT 6* (http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/index.html). A árvore filogenética foi construída com o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6)* em base nos métodos máxima verossimilhança (MVL), modelo Tamura-Nei com completa deleção de "gaps".

3.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, VOLUME CELULAR MÉDIO E BIOVOLUME

Para avaliar o crescimento celular no experimento, foram realizadas amostragens com intervalos de 3 dias (Figura 3.1), exceto pelo 16º dia, onde houve um intervalo de 04 dias. Os cultivos foram depositados em uma câmara de contagem de *Fuchs-Rosenthal* e a observação foi realizada com auxílio de um microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus).

Para utilizar um método mais rápido de contagem de células, a contagem manual foi substituída pela automatizada com auxílio do equipamento CasyCounter (Roche), utilizando um capilar de 150 µm. O equipamento determina o número de células, biovolume e o volume celular médio através do método de exclusão da corrente elétrica. Os valores de volume celular médio, biovolume e número de células foram obtidos diretamente do *CasyCounter*, a partir de 3 contagens efetuadas na mesma amostra. As células foram diluídas em solução de *CasyTon* (Roche) somente no momento da leitura da amostra para evitar variações no volume celular.

Para confirmar a equivalência de resultados entre as contagens manual e automatizada, foram realizadas contagens comparativas que confirmaram a equivalência dos métodos. Assim sendo, o método de contagem manual foi substituído pela contagem automatizada nos experimentos realizados com aeração.



Figura 3.1: Linha temporal com as datas de amostragens e inóculo de fosfato nos cultivos *Sem fosfato*. Os cultivos da microalga *Ankistrodesmus* tiveram duas condições experimentais *Com fosfato* (controle) e *Sem fosfato* ao longo de todo o experimento. O asterisco indica a data em que os cultivos *Sem fosfato* foram divididos em duas partes, onde uma delas recebeu, no 16º dia, a concentração de fosfato semelhante à condição controle.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DA CLOROFILA

Para quantificar a clorofila-*a*, presente nas células de *Ankistrodesmus*, alíquotas dos cultivos *Com Fosfato*, *Sem Fosfato* e *Fosfato adicionado* foram filtrados em filtros de borosilicato (*Glass fibreprefilter* 13400—13, *Sartorius*) em suportes do tipo *Swinnex* 13 mm (marca Millipore) conectados a seringas. Os volumes dos filtrados variaram de acordo com a saturação do filtro (entre 20 mL e 1 mL de cultivo) e foram utilizados para os cálculos da quantificação da clorofila. Todos os filtros foram guardados ao abrigo da luz, envoltos em papel alumínio e mantidos congelados para as análises posteriores.

Antes das análises, os filtros foram picotados e permaneceram *overnight* em 8 mL de acetona 90% diluída em água deionizada. Para evitar a presença de parte dos filtros durante as leituras, as amostras foram centrifugadas a 2500 g, a 4°C por 10 minutos em centrífuga da marca Eppendorf (modelo 5804 R). As absorbâncias foram determinadas em um espectrofotômetro da marca Shimadzu (modelo UV-mini1240) a 665 nm para determinação da clorofila-*a*. Para determinar a concentração de clorofila foi utilizada a fórmula de cálculo segundo Lorenzen (1967).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA

A atividade fotossintética foi determinada de forma automatizada utilizando-se o equipamento *PHYTO-PAM Phytoplankton Analyzer (PHYTO-ED) System*, da marca Heinz Walz GmbH. As amostras foram analisadas em cubeta de quartzo, circular, com 15 mm de diâmetro externo e 13 mm de diâmetro interno, própria para este equipamento. O equipamento operou com o programa *PhytoWin v 1.45*, vinculado a um computador com o sistema operacional *Windows XP*.

Para determinar a atividade fotossintética ou *Quantum Yield*, foram analisadas células dos cultivos *Com fosfato*, *Sem fosfato* e *Fosfato adicionado*, onde pulsos de saturação luminosa foram efetuados na amostra e os valores obtidos diretamente pelo programa.

As células foram diluídas em água deionizada e a diluição foi de: 10 vezes para os dias 0, 3, 6; 100 vezes para os dias 9, 12, 16 e 200 vezes para os dias 19 e 22. Estas diluições foram efetuadas respeitando os limites de detecção do equipamento, visto que um número de células excessivo ultrapassava os valores de leitura do ganho máximo do mesmo.

3.6 DETERMINAÇÃO DO FOSFATO DISSOLVIDO

Para determinar a concentração do fosfato dissolvido no meio de cultivo, 20 mL das amostras foram filtradas em filtro de borosilicato (utilizando-se o mesmo sistema de filtração das análises de clorofila) e o filtrado foi armazenado em frascos de vidro. Estes foram mantidos em freezer a -20°C até a realização das análises.

Os frascos de vidro foram escolhidos para evitar possíveis perdas do fosfato, visto que este pode ser adsorvido ao plástico, no caso de uso de garrafas plásticas. Além disto, toda a vidraria utilizada para determinação deste foi lavada em ácido clorídrico 10% conforme recomendação do método para evitar possíveis contaminações com fosfato presente em detergentes.

Para determinar a concentração do fosfato dissolvido foi utilizada a metodologia colorimétrica do ácido ascórbico descrita no livro *Standard Methods for examination of water and wastewater* (APHA, 1995). As curvas de calibração foram realizadas com o sal KH₂PO₄ anidro nas concentrações 0,17; 0,34; 0,51; 0,68; e 0,86 mg/L, respeitando os limites de detecção do método para que as amostras diluídas permanecessem dentro do intervalo da curva de calibração, considerando uma concentração inicial de 2,4 mg P/L no meio controle (*Com fosfato*).

O método do ácido ascórbico consiste em reagir o ortofosfato com o chamado reagente combinado: ácido ascórbico, molibdato de amônio e o antimônio tartarato de potássio. Ocorre então a redução do ácido fosfomolíbdico formado a azul de molibdênio e a intensidade da cor é proporcional à concentração de ortofosfato disponível. A partir destes, as amostras foram lidas em espectrofotômetro da marca *Shimadzu* (modelo UV mini 1240) no comprimento de onda 880 nm, equipados com cubetas de percurso óptico de 1,0 cm.

3.7 MICROSCOPIA ÓPTICA - CAMPO CLARO

Para a observação das células das linhagens de *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* e *Monoraphidium*, as amostras foram depositadas em diferentes lâminas de vidro, recobertas com lamínulas e observadas em microscópio óptico da marca Olympus (modelo BX51). As imagens de microscopia óptica de campo claro foram obtidas com auxílio de uma câmera Olympus (modelo SC20) e o programa computacional *Cell B* versão 3.0.

3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As células dos cultivos de *Ankistrodesmus* e *Monoraphidium* com 19 dias, e de *Scenedesmus* com 16 dias, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em meio ASM-1 por uma hora para preservar as células para microscopia eletrônica de varredura. Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 2,5% em tampão cacodilato 0,2 M por uma hora. Subseqüentemente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,2 M, aderidas às lamínulas contendo poli-L-lisina e desidratadas em sucessivas soluções de acetona com concentrações crescentes de 7,5; 15; 30; 50; 70; 90% e três vezes na concentração de 100 % por 10 minutos em cada etapa. Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao processo de secagem pelo método do ponto crítico utilizando o equipamento da marca Leica (*EM CPD 030*), e as lamínulas foram aderidas com fitas de carbono em suportes específicos para o microscópio.

As amostras foram metalizadas com 15 nm de ouro no equipamento *Sputter Coater Leica (EM SCD005)* e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura a marca Fei Company (*Magellan*), operando a 2,0 kV, corrente 6,3 pA, e distância de trabalho de 4,2 mm e no microscópio *Nova Nanolab*, *Fei Company* operando a 5 kV, corrente de 98 pA e distância de trabalho de 5,3 mm.

3.9 DETECÇÃO DE LIPÍDEOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Com o intuito de visualizar o acúmulo lipídico intracelular, as células de *Ankistrodesmus* foram coletadas nos intervalos pré-determinados, concentradas por centrifugação (a 3300 g por 10 minutos a 18° C), fixadas em paraformaldeído a 4% por 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida, mantidas em geladeira a 4 ° C até a sua utilização.

Para detectar os lipídeos neutros $1 \ge 10^5$ células/mL foram incubadas com fluorocromo lipofílico *Nile Red* (50µg/mL) por 40 minutos e posteriormente lavadas três vezes em água destilada (Lee *et al.*, 1985). As células marcadas foram observadas em um microscópio confocal de varredura a laser da marca Leica (modelo *TCS SP5*), com o programa de aquisição de imagens *LAS AF*, com laser de excitação de 488 nm e faixa de emissão de 530-538 nm.

3.10 DETECÇÃO DE LIPÍDEOS POR FLUORIMETRIA

Para a detecção de lipídeos, as cepas de *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* e *Monoraphidium* foram marcadas com o fluorocromo *Nile Red* (50 µg/mL), com a concentração de células padronizada para 1×10^6 células/ mL. Nestas, os lipídeos neutros intracelulares foram detectados através de leitura em um espectrofluorímetro da marca Molecular Devices (modelo *Spectra Max M2*) em placas pretas de 96 poços (com 200 µL por poço) durante o experimento piloto. Os comprimentos de onda utilizados para a excitação e emissão foram de 485 nm e 538 nm, respectivamente, e o valor do *cut off* de 530 nm (Elsey *et al.*, 2007).

Nos experimentos de *Ankistrodesmus Com fosfato*, *Sem Fosfato* e *Fosfato adicionado*, as detecções de lipídeos neutros foram verificadas utilizando-se o leitor de microplacas da marca Hidex (modelo *HidexSense*) equipado com o programa *HidexSense Plate Reader*, funcional no sistema operacional *Windows 7*. Para estas análises foram utilizadas 1,6 x 10^6 células/mL e as concentrações de *Nile Red* foram testadas com 20, 10 e 2 µg/mL (dados não apresentados), sendo a resposta suficiente com 10 µg/mL. As amostras foram lidas em microplacas de 96 poços contendo 200 µL de volume por poço. Os filtros usados foram de: excitação 485 nm (com janela de 10 nm) e de emissão 544 nm (com janela de 20 nm).

3.11 LOCALIZAÇÃO DOS COMPARTIMENTOS ÁCIDOS/ POLIFOSFATO USANDO MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As organelas que acumulam fosfato têm a característica de se apresentarem como um compartimento ácido. Baseando-se nisto, foram utilizados os marcadores de fluorescência: laranja de acridina (Vercesi *et al.*, 1994; Miranda *et al.*, 2008) e o marcador 4-6-diamino-2-fenil indol (DAPI) (Scott e Docampo, 2000), ambos se acumulam em compartimentos ácidos. O marcador de compartimentos ácidos *Lysotracker Green (DND-26, Invitrogen)* também foi utilizado para confirmar a marcação destes compartimentos.

As células de *Ankistrodesmus*, presentes em 1 mL de cultivo (com 17 dias) foram centrifugadas (3.000 g por 5 minutos), lavadas em meio ASM-1 uma vez, e marcadas por 10 minutos com laranja de acridina (30 μ g/mL) ou *Lysotracker Green* (2 μ M). Estas foram observadas em um microscópio óptico da marca Leica, com o comprimento de onda de excitação de 488 nm e filtro de emissão acima de 500 nm, utilizando o programa de aquisição de imagens *LAS AF* (Leica).

Para análise dos compartimentos contendo polifosfato, as células com 8 dias de cultivo foram concentradas por centrifugação (3.000 g por 8 minutos) e em seguida incubadas por 30 minutos com DAPI (50 μ g/mL diluído em água deionizada). As células foram observadas em microscópio óptico Zeiss, com comprimento de onda de excitação 370 nm e emissão acima de 500 nm (filtro *longpass*). As imagens foram adquiridas utilizando câmera *AxioCam MR5* e o programa de aquisição de imagens *AxioVision*.

3.12 OBSERVAÇÃO DOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

DETECÇÃO DO POLIFOSFATO EM CÉLULAS INTEIRAS

Os grânulos de polifosfato podem ser visualizados como grânulos elétron densos no microscópio eletrônico de transmissão (MET) utilizando-se células inteiras, ou seja, células sem prévias preparações ou cortes. Nesta técnica, as células foram depositadas diretamente sobre grades de cobre (de 200 *mesh*), utilizadas em microscopia eletrônica de transmissão, previamente cobertas com formvar/carbono. As grades preparadas com

as células de interesse foram colocadas sobre papéis de filtro para que o excesso de líquido fosse transferido e estas permaneceram secando à temperatura ambiente por 15 minutos (Miranda *et al.*, 2000).

As células inteiras de *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* e *Monoraphidium* com 17 dias de cultivo, utilizadas como inóculo no experimento piloto, foram observadas com o MET da *FeiCompany* (*modelo Tecnai G2 Spirit*) operando a 80 kV.

Para realizar a morfometria dos grânulos de polifosfato em *Ankistrodesmus*, esta linhagem foi cultivada e repicada em meios ASM-1 novos, por três vezes, em intervalos de 6, 7 e 14 dias para garantir que os grânulos estivessem repletos. Seguindo a técnica de células inteiras, foram obtidas imagens de 30 células de *Ankistrodesmus* com 14 dias de cultivo, utilizando-se o MET da Fei Company (modelo *Tecnai G2 Spirit*). Após a obtenção das imagens, as mesmas foram analisadas com auxílio do programa *Image J*, e em seguida, foram calculados o diâmetro, o volume e a circularidade dos grânulos de polifosfato. Imagens espectroscópicas mais nítidas dos grânulos foram obtidas utilizando-se o MET da Zeiss (*LEO EM 902*), operando a 120 kV, para a observação com filtro de perda de energia. Estas imagens foram geradas com uma perda de energia de ~60 eV usando uma janela de 20 eV.

Para demonstrar a variação na morfologia dos grânulos, células inteiras de *Ankistrodesmus*, provenientes de cultivos de repiques sucessivos aos 17 e 11 dias, foram observadas em MET da FEI Company (*Tecnai G2 Spirit*).

• DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO UTILIZANDO A MICROANÁLISE DE RAIOS-X

As células inteiras foram analisadas por microanálises de raios-X para determinar a composição dos elementos químicos presentes nos grânulos de polifosfato, visto que esta é capaz de analisar pontualmente e revelar a presença de elementos em regiões específicas na célula.

Os espectros de dispersão de energia por raios-X foram obtidos dos grânulos de polifosfato visualizados nas células inteiras e os espectros controle foram coletados de regiões citoplasmáticas adjacentes aos grânulos e do filme de formvar/ carbono (Miranda *et al.*, 2000). Estas análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão da marca JEOL (*modelo 1200*) com filamento de tungstênio, operando a 80 kV, *spot* com tamanho de 40 nm e corrente de emissão de 10 mA. Os raios-X foram

coletados por 300 segundos usando um detector Si (Li) com uma janela estreita de 0-10 keV com resolução de 10 eV/canal. As análises foram realizadas com um programa de computador *Oxford Link ISIS 3.0 (Oxford Instruments)* conectado ao microscópio. O mapeamento de elementos foi realizado no mesmo microscópio no modo varredura-transmissão.

3.13 OBSERVAÇÃO DOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO E LIPÍDEOS USANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

• CITOQUÍMICA DE LIPÍDEOS – TÉCNICA DO ÓSMIO-IMIDAZOL

O preparo das amostras para observação dos lipídeos acumulados em Ankistrodesmus provenientes das diferentes condições de cultivo foi realizado com base no protocolo modificado de Angermüller e Fahimi (1982). As células foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % e paraformaldeído 4 % em meio ASM-1 por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL da amostra fixada foram lavados em 1,0 mL de tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, as células foram lavadas em tampão imidazol 0,1 M por duas vezes e logo incubadas em ósmio 1% diluído em tampão imidazol 0,1 M por uma hora ao abrigo da luz. As células foram lavadas duas vezes por 10 minutos em tampão imidazol 0,2 M e logo desidratadas em séries crescentes de acetona (50, 70, 90 e na última etapa com acetona 100% por duas vezes). Logo foi iniciada a infiltração das mesmas em resina Spurr (Spurr, 1969) diluída em acetona (1:1) e estas foram mantidas por 24 horas em geladeira para minimizar o efeito de extração da acetona. As mesmas foram centrifugadas a 2.000 g, a 18° C, por 4 minutos para que se formasse um precipitado e se minimizasse a perda de células. Estas foram infiltradas em resina Spurr, sem catalisador por 24 horas, seguidas de Spurr 100 %. O material foi depositado em cápsulas beam, centrifugado a 3.000 g por 10 minutos e a resina foi polimerizada em estufa a 60° C. Os cortes foram feitos com 70 nm de espessura, depositados em grades de cobre de 200 mesh e visualizados diretamente em MET da marca Zeiss (modelo EM 900) a 80 kV e sem pós-contrastação.

• CONTRASTAÇÃO EM BLOCO

Como controle das amostras de citoquímica de lipídeos, foram feitos processamentos do material de *Ankistrodesmus* de diferentes condições de cultivo, fixados em glutaraldeído 2,5 % e paraformaldeído 4 % diluídos em meio ASM-1. Para

isto, 200 μL das amostras fixadas foram lavados em 1 mL de água deionizada, seguidos de acetato de uranila 1 % em água destilada por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetona 50, 70, 90 e 100 % (sendo esta última por duas vezes).

As amostras desidratadas foram infiltradas em resina *Spurr* 50 % em acetona por 24 horas em geladeira a 4° C, seguidas de infiltração em resina pura sem catalisador nas 24 horas seguintes e então em resina com catalisador para polimerização em estufa a 60° C por 48 horas. Posteriormente, as amostras foram cortadas no ultramicrótomo com 70 nm de espessura e coletadas em grades de cobre de 200 *mesh* (De Souza, 2007).

• CONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO COM ALTA PRESSÃO E SUBSTITUIÇÃO A FRIO

Com o intuito de obter melhor preservação da ultra-estrutura das células foram realizados congelamentos por alta pressão e baixa temperatura (De Souza, 2007), utilizando-se o equipamento da marca Leica, modelo EM HPM 100. As células foram centrifugadas (3300 g por 5 minutos) e o precipitado foi depositado em suportes de níquel para um congelamento de 300 µm de espessura. As amostras congeladas foram encaminhadas para o equipamento da Leica, modelo EM AFS2 de substituição a frio, onde as células foram transferidas para o fixador glutaraldeído 2,5 % em acetona seca a -80° C, onde permaneceram por 108 horas. O equipamento foi programado para, após este período, aquecer gradualmente de -80° C para 0° C por cinco horas, permanecer por uma hora a 0° C, aquecer de 0° para 23° C por uma hora. A temperatura foi mantida a 23° C por uma hora e, em seguida, a amostra foi lavada três vezes em acetona seca a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para o ósmio 2 % em acetona seca a 40° C, por quatro horas, sendo lavadas três vezes em acetona seca à temperatura ambiente, e infiltrada em concentrações crescentes com a resina Spurr em acetona seca até atingir a totalidade de resina Spurr (100%). A polimerização da resina foi efetuada em estufa a 60° C, por 72 horas.

Cortes ultrafinos da resina foram obtidas com o ultramicrótomo (*Leica Ultracut UCT*) e coletados em grades de cobre de 300 *mesh*. Os cortes foram contrastados em acetato de uranila 3 % por duas horas a temperatura ambiente e, em seguida, com citrato de chumbo por 10 minutos a temperatura ambiente. Estes foram lavados com água destilada e após secos, foram examinados em um MET da marca Fei Company (modelo *Tecnai G2 Spirit*) a 80 kV.

3.14 PREPARO DA AMOSTRA PARA CROMATOGRAFIA GASOSA

• EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS

Com a finalidade de avaliar os ácidos graxos produzidos pela microalga *Ankistrodesmus* nas diferentes condições de fosfato ao longo de seu cultivo, amostras de cada condição experimental foram centrifugadas a 3.000 g, 10 minutos, 18°C, para retirada do meio de cultivo. Em seguida, as mesmas foram lavadas em água deionizada para retirar o excesso de sal proveniente do meio, evitando que este tivesse efeito na pesagem da biomassa seca. Em seguida, a biomassa úmida foi liofilizada e pesada diretamente em tubos de vidro utilizando balança analítica de alta precisão (marca Mettler Toledo, *modelo AG245*). Para a extração de lipídeos foram utilizadas 8 mg de biomassa seca, adaptando a metodologia de Blight e Dyer (1959), com a finalidade de determinar a presença de lipídeos de interesse na produção de biodiesel. Amostras de tempos iniciais de cultivo apresentaram menores biomassas e foram extraídas de 3 mg.

Para a extração dos lipídeos a biomassa seca recebeu os solventes clorofórmio, metanol e água, nas proporções 1:2:0,8, respectivamente, e ao final foram homogeneizadas em agitador do tipo vortex para garantir a formação de uma única fase. Em seguida, as amostras foram mantidas em um sonicador de banho por 30 minutos, centrifugadas a 3.000 g por 20 minutos a 18° C e o sobrenadante contendo os lipídeos foi reservado. O precipitado proveniente da centrifugação foi ressuspendido nos solventes citados acima e um novo procedimento de extração, semelhante ao acima referido, foi repetido.

O sobrenadante recebeu 1,0 mL de clorofórmio e 1,0 mL de água deionizada, foi homogeneizado em agitador do tipo vortex e centrifugado a 3.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e a fase inferior, orgânica, foi retirada e reservada para seguir para o procedimento de transesterificação.

Todos os tubos usados na extração de lipídeos foram submetidos a procedimento especial de limpeza para evitar a contaminação das amostras com resíduos lipídicos. Estes foram lavados em água, seguidos de alconox sob agitação com vortex, água deionizada, escovação, água deionizada e álcool 70 %.

• PREPARO DOS ÉSTERES METILADOS DOS ÁCIDOS GRAXOS (TRANSESTERIFICAÇÃO)

A amostra dos lipídeos extraídos foi dissolvida em 1,0 ml de tolueno diretamente em um tubo de extração e, em seguida, foram adicionados 2,0 mL de ácido sulfúrico a 1% em metanol. A mistura foi mantida *overnight* em um tubo coberto a 50° C. Posteriormente, foi adicionado 1,0 ml de água deionizada contendo cloreto de sódio 5% e os ésteres necessários foram extraídos duas vezes com 2,0 mL hexano, utilizando pipetas Pasteur de vidro para separar as fases. O solvente foi removido em corrente de nitrogênio gasoso (N₂). O padrão interno de C19 com concentração de 0,5 μ g/ μ L foi adicionado às amostras (Christie, 2003).

• IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDEOS UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

Para determinar a existência de lipídeos de interesse para produção de biocombustíveis, os lipídeos extraídos e transesterificados foram analisados por cromatografia gasosa em um GC-MS da marca Shimadzu (modelo GP 2010 Plus). Neste, foi utilizada uma coluna *HP Ultra 2* (5 % Fenil - metilpolisiloxano), com as medidas 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, da marca Agilent. O injetor foi mantido a 250° C, no modo *splitless*. A temperatura do forno da coluna foi elevada a 40-160° C, com taxa de aquecimento de 30° C/minuto, de 160-233° C, com taxa de aquecimento de 1° C/minuto, de 233-300° C, com taxa de aquecimento de 30° C/minuto e mantida assim por 10 minutos. O hélio foi utilizado como gás de arraste com velocidade linear de 36 cm/seg.

Um volume de 1,0 μ L de amostra foi injetado no cromatógrafo. Para a detecção por espectrometria de massa utilizou-se um detector contendo uma fonte de ionização por elétrons (EI - 70 eV) e um analisador de massas quadrupolo, operado em varreduras de 40 a 440 unidades de massa atômica (u.m.a.). A interface foi mantida a 240°C e a fonte de íons a 240° C.

A identificação dos constituintes da mistura foi feita por comparação dos seus espectros de massas com aqueles da biblioteca *NIST05*, previamente inserida no computador do espectrômetro de massas, assim como com seus tempos de retenção com padrão da marca Sigma (*Supelco 37 Component FAME Mix*). A quantificação foi feita por meio de curva de calibração utilizando o padrão interno metil nonadecanoato – C19 (Sigma).

3.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram realizadas análises de variância de dois fatores (*Two-Way ANOVA*) com medidas repetidas para as análises dos experimentos *Com Fosfato*, *Sem Fosfato* e *Fosfato adicionado* em culturas de *Ankistrodesmus*. Os testes estatísticos foram realizados com o programa *GraphPad Prism 5* (versão 5.01 para *Windows*).

As análises estatísticas dos dados de cromatografia gasosa dos ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados (MUFAS) e ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) foram realizadas no programa *Statistics (Release 7.0)*. Foi feita uma análise de variância fatorial com medidas repetidas e variáveis dependentes. Os resultados dos ácidos graxos foram agrupados em MUFAs, PUFAs e saturados, onde os valores foram transformados para LOG de base 10. Valores de probabilidade abaixo de 0.05 (P< 0.05) foram considerados estatisticamente significantes para este estudo.

4. RESULTADOS

PARTE I – DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS ESTUDADAS

4.1 OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Ao visualizar as linhagens das clorofíceas com auxílio do microscópio óptico foi possível verificar que as células de *Ankistrodesmus* são encontradas, em sua maioria, sob a forma de células individualizadas (**Figura 4.1a**), porém poucas células foram observadas torcidas em torno de si e espiraladas sobre outras (**Figura 4.1b**). As células apresentaram formato típico, sendo elas alongadas, com extremidades afiladas, comprimento acima de 30 μ m e sem mucilagem.

Já as células de *Monoraphidium* apresentaram-se individualizadas, espiraladas ou com formato sigmoidal, sem pirenóides ou mucilagem (**Figura 4.2**). Além disto, em algumas células podem-se verificar regiões translúcidas, sem a coloração esverdeada característica, onde não ocorre a presença do único cloroplasto (**Figura 4.2b**), já que o núcleo ocupa um grande volume na região central da célula. Isto também ocorre em algumas células de *Scenedesmus* (**Figura 4.3**).

Em *Scenedesmus*, as células observadas se apresentaram formando estruturas coloniais, onde são verificados cenóbios, em geral, contendo com 4 células e, algumas células solitárias/individualizadas ou em divisão. Neste gênero, os pirenóides foram bastante evidentes na região central das células (**Figura 4.3**), enquanto que estes não foram observados nas linhagens de *Ankistrodesmus* e *Monoraphidium*.



Figura 4.1: Apresentação da morfologia de *Ankistrodesmus* (ANRF-01) por microscopia óptica de campo claro. **a** - Células individualizadas com as extremidades afiladas; **b** - São observadas duas células torcidas em torno de si. Barra de escala: 10 µm.



Figura 4.2: Apresentação da morfologia de *Monoraphidium* (MORF-01) por microscopia óptica de campo claro. **a** - Observa-se que as células de *Monoraphidium* são levemente espiraladas, com pontas bastante afiladas; **b** - Possível notar regiões translúcidas, devido à ausência de cloroplastos naquele local. Barra de escala: $10 \,\mu$ m.



Figura 4.3: Apresentação da morfologia de *Scenedesmus* (SCLJ-01) por microscopia óptica de campo claro. **a** - Possível observar cenóbio com 4 células e uma célula em processo de divisão. Em todas as células é possível observar uma região onde ocorre a ausência do cloroplasto; **b** – Imagem a em maior aumento para melhor observação de um cenóbio de *Scenedesmus* (SCLJ-01), onde os pirenóides são bastante evidentes no centro da célula. Barra de escala: 10 μ m.

4.2 OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Nas microscopias eletrônicas de varredura foi possível notar que a parede celular de *Ankistrodesmus* (ANRF-01) apresenta-se lisa (**Figura 4.4 a**) e com algumas invaginações (**Figura 4.4 b** e c). Com 19 dias, foi possível observar finas estruturas que partem da superfície da parede celular (**Figura 4.4 d**), tornando-a mais rugosa, bem como projeções saindo da extremidade das células (**Figura 4.4 e** e **f**).

A superfície celular de *Monoraphidium* (MORF-01) apresentou-se bastante homogênea, com algumas pequenas reentrâncias arredondadas e com poucas linhas tênues, que pareciam seguir ao longo do comprimento de toda a célula (**Figura 4.5**).

Já as células de *Scenedesmus* (SCLJ-01) apresentaram uma superfície com grande número de ondulações que seguiam ao longo do comprimento de toda a célula e com algumas ondulações transversais (**Figura 4.6**) formando uma rede, que evidencia as estrias ou costelas presentes em toda a parede celular. Estas reentrâncias parecem com as verificadas em menor número em *Monoraphidium* e *Ankistrodesmus*.

Raros cenóbios contendo oito células foram encontrados (**Figura 4.6a**) e alguns cenóbios com 4 indivíduos (**Figura 4.6 b**) apresentaram projeções que saiam das extremidades celulares (**Figura 4.6 d** e e). Estas projeções quando presentes nas células localizadas no meio do cenóbio pareciam estar apoiadas sobre as paredes das células vizinhas (**Figura 4.6 c**).



Figura 4.4: Observação da morfologia e parede celular de *Ankistrodesmus* (ANRF-01) por microscopia eletrônica de varredura. **a** - Imagem mostrando sua parede celular lisa (Barra de escala de 5 μ m); **b** e **c** - Detalhes das invaginações na superfície da célula (Barra de escala 1 μ m e 500 nm, respectivamente); **d** - Imagem de outra célula de *Ankistrodesmus*, onde é possível observar a parede celular com estruturas que a tornam mais rugosa, possivelmente polissacarídeos. (Barra de escala 10 μ m); **e** - Detalhe da parte externa da parede celular, onde se verificam projeções sobre toda a superfície celular (Barra de escala 500 nm); **f** - Detalhe da extremidade terminal da célula, onde se observam projeções (Barra de escala 500 nm). Imagens a, b e c foram obtidas com microscópio *Nova Nanolab* e as imagens **d**, **e** e **f** foram obtidas com o microscópio *Magellan*.



Figura 4.5: Observação da morfologia e parede celular de *Monoraphidium* (MORF-01) por microscopia eletrônica de varredura. **a** – Imagem de uma célula típica, com perfil levemente torcido (Barra de escala 5 μ m); **b** – Detalhe em grande aumento da superfície da parede celular de *Monoraphidium* (Barra de escala 500 nm). Imagens obtidas com o microscópio *Magellan*.



Figura 4.6: Observação da morfologia e parede celular de *Scenedesmus* (SCLJ-01) por microscopia eletrônica de varredura. **a** e **b** – Imagem de um cenóbio contendo oito indivíduos e quatro indivíduos, respectivamente (Barra de escala 5 µm); **c** – Detalhe da superfície da parede celular (Barra de escala 1 µm); **d** – Detalhe de uma célula presente no meio do cenóbio, onde se verifica uma pequena projeção que alcança e está apoiada sobre uma célula vizinha. **e** – Detalhe de uma projeção que parte de uma das células presentes em um dos polos do cenóbio (Barras de escala 500 nm). Imagens obtidas com o microscópio *Nova Nanolab*.

4.3 SELEÇÃO DA LINHAGEM DE ESTUDO ATRAVÉS DA MARCAÇÃO DE LIPÍDEOS NEUTROS USANDO MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E FLUORIMETRIA

Para determinar a linhagem de microalga de estudo dentre as clorofíceas analisadas, *Ankistrodesmus, Monoraphidium* e *Scenedesmus,* foi utilizado o marcador lipofílico *Nile Red*, para detecção de lipídeos neutros (**Figura 4.7 a, c** e e). Foi observada uma marcação positiva em todas as linhagens testadas, ou seja, todas apresentaram lipídeos neutros, indicando que as linhagens de clorofíceas selecionadas poderiam ser candidatas ao uso e produção de biocombustíveis.

Dentre estas, foi verificado por microscopia de fluorescência, que a linhagem capaz de acumular maiores quantidades de lipídeos foi a de *Ankistrodesmus*. Nesta, as células apresentaram gotas lipídicas distribuídas ao longo de todo o comprimento celular (**Figura 4.7 a**). As cepas de *Monoraphidium* e *Scenedesmus* também apresentaram quantidades consideráveis de lipídeos, porém estes não ocupavam todo o comprimento celular (**Figura 4.7 c** e e). Além disto, foi verificado que a linhagem de *Scenedesmus* demonstrou ter gotas lipídicas de maior tamanho, que as presentes em *Ankistrodesmus*.

Entretanto, ao quantificar a intensidade de fluorescência por fluorimetria (no experimento piloto de 15 dias de cultivo), foi possível notar que ao inocular as células em um novo meio, houve uma redução na detecção de lipídeos, que ocorre principalmente nos três primeiros dias de cultivo em *Ankistrodesmus* e em *Monoraphidium* e até o 11° dia em *Scenedesmus* (**Figura 4.8**). Após este período, a microalga que retomou mais rapidamente o acúmulo dos lipídeos foi a cepa de *Ankistrodesmus* (ANRF-01), cujo aumento ocorreu após o 7° dia de cultivo. Além disto, esta linhagem também foi a que apresentou maior acúmulo de lipídeos dentre as três linhagens durante todas as etapas do cultivo.



Figura 4.7: Detecção de lipídeos neutros e autofluorescência em *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium* e *Scenedesmus*. Em amarelo, está a detecção de lipídeos neutros e em vermelho é possível observar a autofluorescência da clorofila nas microalgas *Ankistrodesmus* (**a**, **b**), *Monoraphidium* (**c**, **d**) e *Scenedesmus* (**e**, **f**) (Barra de escala: 25μ m).



Figura 4.8: Detecção dos lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* (ANRF), *Monoraphidium* (MORF) e *Scenedesmus* (SCLJ) por fluorimetria em experimento piloto com duração de 15 dias de cultivo. As células foram marcadas para lipídeos neutros com o corante *Nile red*. Observa-se maior intensidade de fluorescência em *Ankistrodesmus*, que em *Monoraphidium* e *Scenedesmus*.

4.4 DETECÇÃO DOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO EM CÉLULAS INTEIRAS DE ANKISTRODESMUS, SCENEDESMUS E MONORAPHIDIUM

Para verificar se as microalgas *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* e *Monoraphidium* continham grânulos de polifosfato, foram depositadas células inteiras, diretamente dos cultivos, ou seja, sem tratamento prévio, em grades com filmes de *formvar* e estas foram observadas em um microscópio eletrônico de transmissão. Foi possível verificar que as três espécies de microalgas apresentavam grânulos elétron densos que correspondem aos grânulos de polifosfato (**Figura 4.9**). Observou-se que a microalga *Ankistrodesmus* (ANRF-01) apresentava um maior número de grânulos (**Figura 4.9 a e b**), que as outras duas linhagens (**Figura 4.9 c - f**). Além disto, os grânulos presentes na microalga *Ankistrodesmus* apresentaram-se mais homogêneos, com formato arredondado (**Figura 4.9 b**), enquanto que na microalga *Scenedesmus* os grânulos elétron-densos não apresentaram, em sua maioria, um formato regular (**Figura 4.9 c e d**). Isso pode indicar um possível uso do fosfato estocado ali presente. Já a microalga *Monoraphidium* apresentou um pequeno número de grânulos de polifosfato, porém com formato arredondado (**Figura 4.9 e f**). O maior número de grânulos de polifosfato presentes na microalga *Ankistrodesmus*, juntamente com uma maior marcação de lipídeos foram

parâmetros determinantes para a escolha da microalga *Ankistrodesmus* como a cepa de trabalho para os estudos seguintes.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DA CEPA DE *ANKISTRODESMUS* POR BIOLOGIA MOLECULAR

Ao utilizar a técnica de PCR e amplificação dos domínios D1 e D3 do rRNA 26S, com os *primers* universais D1R (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3') e D3F (5'-ACGAAGGATTTGCACGTCAG-3') foram obtidas sequências da microalga clorofícea do gênero *Ankistrodesmus*. Com a sequência do DNA ribossomal (rDNA) da subunidade maior do ribossomo (LSU) obtida a partir da cepa ANRF-01 e outras sequências de Cholorophyceae disponíveis no *GenBank* (NCBI, 2009) foi construída a árvore filogenética, que revelou que a microalga *Ankistrodesmus* (nomeada na árvore como ANK2201) corresponde à espécie *Ankistrodesmus stipitatus*, visto que a cepa de trabalho apresentou 100% de homologia (**Figura 4.10**) com a sequência (AF183447) depositada no *GenBank*. A sequência da *Prototheca stagnora* utilizada como "*outgroup*" demonstrou estar de acordo com o proposto.



Figura 4.9: Visualização dos grânulos de polifosfato nas células inteiras de *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* e *Monoraphidium* utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. **a** e **b** – *Ankistrodesmus*; **c** e **d** – *Scenedesmus*; **e** e **f** – *Monoraphidium*. Foi possível observar que os grânulos elétron densos, correspondentes aos grânulos de polifosfato estão presentes em maior número na microalga *Ankistrodesmus* e também com formato arredondado mais homogêneo (Barras de escala de 2 µm em **a**, **c**, **d**, **e**, **f**; em **b** 1 µm).



0.05

Figura 4.10: Árvore filogenética usando máxima verossimilhança (MVL) nas análises de sequências LSU rDNA de cepas de Chlorophyceae e da cepa de Ankistrodesmus. A sequência obtida neste estudo está em negrito como ANK2201 LSU e apresentou 100% de homologia com Ankistrodesmus stipitatus. As demais sequências incluindo o outgroup (Prototheca stagnora) foram obtidas no GenBank. Outras sequências, presentes em negrito na árvore, foram analisadas em conjunto. Valores de bootstrap ML são relatados nos nós. Barra de escala corresponde a 0,05% de divergência.

PARTE II – AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS DA LINHAGEM DE ANKISTRODESMUS

4.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E BIOVOLUME DA LINHAGEM DE *ANKISTRODESMUS*

Ao analisar as curvas de crescimento de *Ankistrodesmus* em experimento com e sem aeração (**Figura 4.11**) é possível notar que as células mantidas sem aeração tiveram crescimento celular mais lento, que nos cultivos com aeração, onde o número de células ultrapassou a densidade de 10^7 células/mL.

A adição de fosfato ao meio, com 16 dias de cultivo, promoveu um aumento no número de células. Este ocorreu de maneira mais acentuada nos cultivos com aeração entre os dias 16 e 19. Entretanto, nos cultivos sem aeração, esse aumento do número de células é observado entre o 19° e o 22° dias, indicando que este ocorre de forma mais lenta na condição *Sem fosfato*.

A ausência de fosfato no meio também afetou o biovolume médio nas células de *Ankistrodesmus*, já os maiores aumentos no biovolume foram observados na condição S*em fosfato*, ocorrendo com intervalos aproximados de 3 dias. Além disto, foi observado que a adição de fosfato no 16º dia ao meio promoveu uma redução no biovolume médio das células, fazendo com que estas atingissem um biovolume médio semelhante ao observado na condição controle (**Figura 4.12**).

Ao analisar o biovolume/mL verificou-se que as condições *Com* e *Sem fosfato*, tiveram perfil de crescimento semelhantes até o 9° dia, indicando que o crescimento é sustentado pelo fosfato intracelular até este período (**Figura 4.12**). Após o nono dia, verifica-se que as células na condição *Com fosfato* tem um crescimento mais acelerado, quando comparadas às *Sem fosfato*. A adição de fosfato promoveu um estímulo ao aumento do número de células, sendo este observado de maneira ainda mais intensa entre os dias 19 e 22.



Figura 4.11: Curvas de crescimento da microalga *Ankistrodesmus* cultivada sem aeração (**A**) e com aeração (**B**) durante 22 dias. Cultivos mantidos na presença de fosfato tem um crescimento celular mais rápido, que cultivos mantidos sem fosfato Além disto, a adição de fosfato no 16° dia promove um novo aumento do número de células. Este aumento ocorre de forma mais rápida (3 dias) quando os cultivos são mantidos sob aeração, ou seja, com maior disponibilidade de CO₂.



Figura 4.12: Variação do volume celular médio e biovolume/mL de *Ankistrodesmus* nas diferentes condições de fosfato no cultivo. Na condição *Sem fosfato*, as células apresentaram picos de variação no volume celular médio (A), apresentando células de maior biovolume. Ao adicionar fosfato ao meio após 16 dias, as células tiveram seu biovolume reduzido e atingiram volumes semelhantes aos observados nas células da condição controle. As condições de cultivos analisadas foram: *Com fosfato* (azul), *Sem fosfato* (vermelho) e *Adição de fosfato* (verde). Volume médio (A), Biovolume/mL (B).

4.7 ANÁLISE DA CLOROFILA E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA

Ao avaliar a concentração de clorofila por célula em *Ankistrodesmus* ao longo de 22 dias de cultivo, utilizando ANOVA *Two way* com medidas repetidas e pós teste de *Bonferroni*, foi verificado que não houve variação significativa na concentração deste pigmento entre os diferentes tratamentos (**Figura 4.13**), indicando que a ausência de fosfato não exerceu efeito sobre a quantidade de clorofila por célula. Ao analisarmos os dados de clorofila observando a quantidade de clorofila por litro (**Figura 4.14**), verificase um aumento da mesma, que ocorre em função do aumento do número de células no meio, porém não se traduz em um aumento de clorofila por célula.

Já ao avaliar a atividade fotossintética de Ankistrodesmus verifica-se que esta sofreu um aumento até o 3º dia na condição Sem fosfato e até o 6º dia na condição
controle *Com fosfato* (Figura 4.15), indicando que a condição *Com fosfato* conseguiu manter a atividade fotossintética máxima por mais tempo quando comparada com a condição *Sem fosfato*.

Em ambas as condições houve redução da atividade fotossintética ao longo do tempo de cultivo e chegaram a valores mínimos semelhantes, porém a condição *Sem fosfato* chegou ao valor mínimo de atividade com apenas 19 dias, enquanto que a condição *Com fosfato* só atingiu este limiar no 22° dia. Além disto, a condição *Com fosfato* só atividade fotossintética bastante semelhante entre o 6° e o 12° dias, com uma redução da atividade sendo mais significativa a partir do 12° dia, enquanto que neste mesmo período as células mantidas na ausência de fosfato já apresentavam redução na atividade fotossintética.

A adição de fosfato no meio promoveu um aumento na atividade fotossintética nos 3 primeiros dias, ou seja, entre o 16º e o 19º dias, ficando próxima ao valor de atividade máxima observada na condição controle *Com fosfato* (**Figura 4.15**) no início do cultivo.



Figura 4.13: Concentração de clorofila por célula (pg/cel) em *Ankistrodesmus* cultivada na presença e ausência de fosfato. As análises estatísticas *ANOVA* com medidas repetidas indicam que não existe diferença significativa na concentração de clorofila por célula entre as condições de cultivo, indicando que a ausência de fosfato não tem efeito sobre a quantidade de clorofila. As condições de cultivos analisadas foram: *Com fosfato* (azul), *Sem fosfato* (vermelho) e *Adição de fosfato* (verde). As barras verticais indicam um intervalo de confiança de 0,95.



Figura 4.14: Concentração de clorofila por litro (μ g/L) em *Ankistrodesmus* nas condições de cultivo *Com*, *Sem* e *Adição de fosfato*. A concentração de clorofila por litro é maior na condição controle *Com Fosfato* que na condição *Sem fosfato*. Além disto, há um aumento de clorofila com a adição de fosfato no meio indicando maior densidade celular. As condições de cultivos analisadas foram: *Com fosfato* (azul), *Sem fosfato* (vermelho) e *Adição de fosfato* (verde). As barras verticais indicam o desvio padrão.



Figura 4.15: Avaliação da atividade fotossintética de *Ankistrodesmus* nas condições *Com fosfato*, *Sem fosfato* e *Adição de Fosfato*. A atividade fotossintética sofre aumento até o 6º dia na condição *Com Fosfato* (linha azul) e até o 3º dia quando na ausência de fosfato (linha vermelha). A condição *Com fosfato* apresenta redução da atividade fotossintética mais significativa após o 12º dia, enquanto que na condição *Sem fosfato* isto ocorre a partir do 6º dia. Ao disponibilizar mais fosfato no meio de cultivo no 16º dia, verifica-se um novo aumento na atividade fotossintética (linha verde). As barras verticais indicam o desvio padrão.

4.8 ANÁLISE DO FOSFATO DISSOLVIDO NO MEIO

As concentrações de fosfato dissolvido no meio de cultivo foram testadas antes e após o inóculo das células, nas condições *Com Fosfato* e *Sem Fosfato*, para garantir que nenhum fosfato proveniente do cultivo anterior fosse adicionado ao novo meio. Desta forma, foi verificado que os valores de fosfato dissolvido antes e após os inóculos eram semelhantes (**Figura 4.16**, em azul, tempo zero), indicando que nenhum fosfato estava presente, além do fornecido no novo meio.

Na condição *Com fosfato*, o fosfato dissolvido no meio demonstrou ser reduzido do meio a partir do 3° dia, atingindo valor mínimo no 16° dia de cultivo e manteve este nível até o final do experimento (23 dias) (**Figura 4.16**). As análises estatísticas indicaram que a diferença foi significativa ao comparar as condições ao longo do tempo em todas as condições testadas (F(16,48)=638,99 e p < 0,01).

O fosfato, adicionado ao meio no 16º dia, foi fornecido em concentração semelhante à dada ao meio controle no tempo zero e este foi completamente consumido do meio de cultivo no intervalo de 3 dias, demonstrando que o consumo foi mais rápido que na condição controle (**Figura 4.16**, em verde, tempo 16 dias).



Figura 4.16: Variação da concentração de fosfato dissolvido no meio de cultivo com a microalga *Ankistrodesmus*. Na condição controle (Azul), o fosfato passa a ser consumido após o 3º dia de cultivo e este aparece atingir o valor mínimo no meio no 16º dia, condição esta que persiste até o final do experimento no 23º dia. A condição *Sem fosfato* (Vermelho) está demonstrada no gráfico somente para indicar a ausência deste no meio de cultivo.

O método espectrofotométrico se mostrou confiável para análise do consumo de fosfato de dissolvido, mesmo reduzindo os volumes das soluções de trabalho utilizadas na construção da curva de calibração do fosfato, comparando ao protocolo definido no *Standard Methods* (APHA, 1995). Isto se demonstra com a boa linearidade apresentada na curva de calibração, conforme representado na **Figura 4.17**, cujo valor de R^2 é de 0,99.



Figura 4.17: Curva de calibração de fosfato pelo método espectrofotométrico. O método apresenta uma boa linearidade ($R^2 = 0.9996$), mesmo reduzindo os volumes das soluções de trabalho, comparando ao *Standard Methods*. (**U.A.**, unidades arbitrárias).

PARTE III – ANÁLISES DOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO EM ANKISTRODESMUS

4.9 DETECÇÃO DOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Considerando que os grânulos de polifosfato têm a característica de apresentarem-se como um compartimento ácido, a utilização dos marcadores de tais compartimentos foi positiva utilizando-se tanto o marcador laranja de acridina (**Figura 4.18**). Ao utilizar este marcador na microalga *Ankistrodesmus* (ANRF-01) foi possível observar, por microscopia óptica de campo claro, os compartimentos onde ocorreram acúmulos do corante (**Figura 4.18 a**). Com a microscopia de fluorescência as células apresentaram marcação vermelha intensa (**Figura 4.18 b**).

A marcação dos compartimentos ácidos também foi confirmada utilizando-se outro marcador, o *Lysotracker Green* (Figura 4.19), onde foi possível observar uma marcação em amarelo, devido ao somatório das cores vermelho, da autofluorescência proveniente da clorofila, com a cor verde do marcador. Nas extremidades das células, onde não havia a presença de clorofila, foi possível observar os grânulos em verde. Com a utilização de ambos os marcadores foi possível observar a localização central do núcleo, dada a sua característica ácida.

O uso de DAPI para detecção de grânulos de polifosfato é feita utilizando-se comprimento de onda acima do usado para a detecção do núcleo celular. Assim sendo, os grânulos de polifosfato também foram observados na microalga *Ankistrodesmus*, com este marcador, como se observa na **Figura 4.20.** Nota-se que o núcleo celular não é visualizado utilizando-se comprimento de onda acima de 500 nm, portanto a região central da célula aparece apenas em vermelho, devido à presença da clorofila.



Figura 4.19: Marcação dos compartimentos ácidos com *Lysotracker* Green em *Ankistrodesmus* (ANRF-01). Em amarelo é possível visualizar a marcação dos compartimentos ácidos. Esta cor é resultado do somatório da cor verde do marcador com vermelho da autofluorescência (Barra de escala: $10 \,\mu$ m).



Figura 4.20: Marcação dos grânulos de polifosfato com DAPI em *Ankistrodesmus*. Os grânulos de polifosfato são observados em amarelo distribuídos ao longo de todo o comprimento celular, exceto na região central, local em que está situado o núcleo (Barra de escala: $10 \mu m$).

4.10 OBSERVAÇÃO DOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Foi possível a observação dos grânulos de polifosfato nas células de *Ankistrodesmus*, que vieram do congelamento ultra-rápido, usando a microscopia eletrônica de transmissão (**Figura 4.21 a e b**). Parte do conteúdo dos grânulos foi perdido durante o processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão, devido à natureza não-fixável do material ali contido. Isto fez com que se observasse apenas um conteúdo escuro nas bordas dos grânulos ou um conteúdo residual em uma extremidade deste como observado na **Figura 4. 21 a e b**. O processamento de amostras com congelamento das células pode reduzir a perda deste material (**Figura 4. 21 c-f**), entretanto eventuais perdas ainda podem ocorrer.

Ao observar cortes longitudinais da célula de *Ankistrodesmus*, pode-se visualizar um acúmulo de grânulos elétron densos, semelhantes aos grânulos de polifosfato, ao longo do comprimento de toda a célula (**Figura 4.21 c** e **d**), dado que está de acordo com o que foi observado na célula inteira e na marcação dos compartimentos ácidos. Já nos cortes transversais, observa-se a localização próxima aos cloroplastos (**Figura 4.21 e** e **f**).



Figura 4.21: Grânulos de polifosfato em células de *Ankistrodesmus* (ANRF-01) submetidas a congelamento ultra-rápido com alta pressão. **a** e **b** - Células com os conteúdos dos grânulos de polifosfato parcialmente perdidos (Barra de escala de 5 μ m e 200 nm, respectivamente); **c** - Corte longitudinal mostrando distribuição dos grânulos ao longo da célula (Barra de escala 1 μ m); **d** - Imagem **c** em maior aumento (Barra de escala: 500 nm); **e** - Corte tranversal da célula; **f** - Imagem em grande aumento (Barra de escala 500 e 100 nm, respectivamente).

4.11 OBSERVAÇÃO DE CÉLULAS INTEIRAS DE ANKISTRODESMUS

Ao observar as células inteiras da microalga *Ankistrodesmus* (ANRF-01) utilizando-se a imagem espectroscópica (*contrast tuning*) (Figura 4.22) foi possível verificar que as organelas que contém fosfato também parecem estar distribuídas de

maneira alinhada (**Figura 4.22 b**) ao longo da célula e parecendo apresentar uma localização preferencial em um dos hemisférios da célula.



Figura 4.22: Organização dos grânulos elétron densos na microalga *Ankistrodesmus* (ANRF-01) observada por imagem espectroscópica. **a** - Células inteiras de *Ankistrodesmus* (Barra de escala: 500 nm); **b** - Maior aumento da extremidade de células mostrando os grânulos alinhados (Barra de escala: 200 nm). A imagem espectroscópica (*contrast tuning*) mostra as organelas que contém fosfato, distribuídas ao longo da célula, com uma organização em linha e com preferência por um dos hemisférios da célula.

4.12 MORFOMETRIA DOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO EM ANKISTRODESMUS

Analisando células de *Ankistrodesmus* em cultivo após 14 dias, pode-se verificar que os grânulos de polifosfato presentes apresentaram morfometria bastante homogênea quando estas foram submetidas a sucessivos repiques em meios ASM-1 repletos de nutrientes em curtos intervalos de tempo 7 e 6 dias. As células apresentam em média 76 grânulos de polifosfato, com diâmetro médio de 286 nm, volume de 1,37 x 10^7 nm³ e circularidade de 0,97 (**Tabela 4.1**), sendo o valor 1 considerado para uma esfera perfeita.

Tabela 4.1: Análises morfométricas dos grânulos de polifosfato da microalga *Ankistrodesmus*. Pode se verificar o número de grânulos de polifosfato por célula, diâmetro, volume e circularidade. Os resultados são expressos como valores médios e o erro padrão.

	Grânulos de polifosfato por célula	<u>Diâmetro</u> (nm)	Volume (nm³)	Circularidade
Ankistrodesmus	76 ± 7,0	286,8 ± 7,2	1,3702e+007 ± 1,0e+006	0,9749 ± ,009337

Foi possível observar que os grânulos de polifosfato de *Ankistrodesmus* sofrem alterações em sua morfologia dependendo das condições nutricionais do meio de cultivo em que se encontram e perdem o aspecto circular. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das células inteiras permitiram observar que quando submetidos à condições sucessivas de renovação de nutrientes no meio e em fase exponencial, os grânulos apresentam morfologia arredondada enquanto que após intervalos maiores para a renovação de nutrientes, estes grânulos parecem estar sendo consumidos e perdem a morfologia arredondada. Assim, é possível notar que os grânulos apresentam-se com forma irregular, semelhante à meia lua ou com conteúdo elétron lucente no centro dos mesmos (**Figura 4.23**).



Figura 4.23: Variação na morfologia dos grânulos de polifosfato de *Ankistrodesmus*. Imagem de células inteiras observadas por microscopia eletrônica de transmissão. **a** - Grânulos de polifosfato esféricos em células em fase estacionária (Barra de escala 2 μ m); **b** e **c** - Grânulos de polifosfato com morfologia irregular durante a fase exponencial do cultivo (Barra de escala 500 nm e 1 μ m, respectivamente).

4.13 COMPOSIÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS NOS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO

Para detectar os elementos químicos presentes nos grânulos elétron densos de polifosfato foram realizadas microanálises de raios-X na microalga *Ankistrodesmus* (**Figura 4.24**). Nestes grânulos, os elementos fósforo, potássio, sódio, cálcio magnésio, além de carbono e oxigênio, foram detectados através da emissão de espectros de raios-X característicos.

O sinal de cobre detectado foi proveniente da grade utilizada no suporte das células e os dois picos de cálcio e cobre correspondem às duas linhas de emissão de raios-X (K α e K β) destes elementos, que correspondem às transições entre as camadas atômicas L e K, e M e K, respectivamente.

Microanálises pontuais foram realizadas em regiões correspondentes aos grânulos de polifosfato de *Ankistrodesmus* com 22 dias de cultivo (**Figura 4.25 A**), na presença de fosfato (no experimento sem aeração), tendo sido detectada grande quantidade de fósforo nestes grânulos (**Figura 4.25 C**). Além disto, também foram mapeados os corpos elétron lucentes, possivelmente os corpúsculos lipídicos (**Figura 4.25 B**), em células de *Ankistrodesmus* com 22 dias cultivados *Sem fosfato* (**Figura 4.25 D**). Controles negativos foram feitos em regiões citoplasmáticas (**Figura 4.25 E**), onde não foram observados picos de fósforo.



Figura 4.24: Mapeamento de elementos químicos nos grânulos elétron densos de *Ankistrodesmus*. **a** - Perfil dos elementos químicos detectados em um grânulo elétron denso. O sinal de cobre detectado é proveniente da grade; **b** - Imagem de transmissão da região selecionada para a o mapeamento de elementos. **c**-**j** Microanálise de raios-x da região mostrada em b, detectando os elementos químicos presentes na célula. Observa-se a localização dos elementos carbono (C), oxigênio (O), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), potássio (K) e cálcio (Ca). Barra de escala: 500 nm.



Figura 4.25: Mapeamento de elementos químicos nos grânulos de polifosfato de *Ankistrodesmus* e nos corpos elétron lucentes em cultivos na presença e ausência de fosfato. **A** – Imagem de MET dos corpos de polifosfato em células de *Ankistrodesmus* com 22 dias cultivadas na presença de fosfato (experimento sem aeração); **B** – Análise do perfil dos elementos químicos detectados em um grânulo elétron denso na condição *Sem Fosfato* (22 dias) na região indicada como base 7 (em **A**); **C** – Imagem de MET dos corpos lipídicos em células de *Ankistrodesmus* com 22 dias cultivadas na presença de fosfato (experimento sem aeração); **D** – Análise do perfil dos elementos químicos detectados em um corpo elétron lucente observado na condição Sem *Fosfato* (22 dias) na região observada como base 11 (em **B**); **E** – Análise do perfil dos elementos químicos, ao lado de em um corpo elétron lucente, observado na condição Sem *Fosfato* (22 dias). O sinal de cobre detectado é proveniente da grade. Barra de escala: 0,5 µm.

PARTE IV – ANÁLISE DOS LIPÍDEOS DE *ANKISTRODESMUS* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.14 DETECÇÃO DE LIPÍDEOS POR FLUORIMETRIA

Para avaliar se as diferentes condições de fosfato no meio exerceram efeito no acúmulo de lipídeos neutros, os mesmos foram marcados com o corante lipofílico *Nile Red* e a intensidade de fluorescência foi avaliada por fluorimetria (**Figura 4.26**). Assim, foi verificado que existe diferença significativa entre os tratamentos (P=0,0187). Além disto, foi verificado que existe uma variação ao longo do tempo (P<0,0001).

Quando a condição controle (*Com fosfato*) é comparada à condição *Sem fosfato* verifica-se que a diferença é significativa a partir do 16° dia de cultivo (P<0,01) e que esta diferença torna-se ainda maior no 20° e no 23° dias (P<0,001). Isto indica que a partir do 16° dia de cultivo, o acúmulo de lipídeos neutros na condição *Sem Fosfat*o é notória.



Figura 4.26: Detecção de lipídeos neutros na microalga *Ankistrodesmus* cultivada sem aeração durante 22 dias. As condições de cultivos analisadas foram: *Com fosfato* (azul), *Sem fosfato* (vermelho) e *Fosfato adicionado* (verde). U.A. = unidades arbitrárias.

No 16° dia, houve uma diferença significativa na detecção de lipídeos neutros entre as condições *Com fosfato* e *Fosfato adicionado* (valor de P <0,01). Após a adição de fosfato no meio, esta diferença é reduzida no 20° dia, e ao chegar no 23° dia não existe mais diferença significativa. Isto indica que ao adicionar fosfato no meio de

cultivo, a quantidade de lipídeos neutros é reduzida gradativamente e chega a níveis semelhantes ao controle.

Quando se compara a condição *Sem fosfato* e *Fosfato adicionado* pode se observar que a redução dos lipídeos neutros passa a ser significativa no 23° dia (P<0,01) na condição *Fosfato adicionado*.

4.15 DETECÇÃO DE LIPÍDEOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Ao observar os lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* por microscopia confocal, nota-se que os cultivos controle com 8 dias (**Figura 4.27**) não apresentam acúmulos de lipídeos em corpos lipídicos (**Figura 4.27b**). Entretanto, este acúmulo já se verifica nas células cultivadas na ausência de fosfato (**Figura 4.28b**).

Após 19 dias de cultivo, a condição controle apresenta maior quantidade de corpos lipídicos quando comparado a 8 dias, indicando que existe um acúmulo ao longo do tempo de cultivo (**Figura 4.29b**). Este acúmulo de lipídeos neutros é ainda mais evidenciado na condição *Sem fosfato* (**Figura 4.30b**), onde os corpos lipídicos estão presentes ocupando todo o comprimento da célula e apresentam corpos lipídicos de grandes volumes (**Figura 4.30h**).

Após a adição de fosfato, as células foram novamente verificadas com 25 dias para determinar se os corpos lipídicos ainda estavam presentes. Foi observado que os corpos lipídicos se mantêm (**Figura 4.31b**), porém com menores volumes que os observados com 22 dias.



Figura 4.27: Marcação de lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* cultivados na condição *Com fosfato* com 8 dias. Observação das células das células em campo claro ($\mathbf{a} \in \mathbf{d}$). Observação dos lipídeos neutros, marcados com *Nile red*, em amarelo ($\mathbf{b} \in \mathbf{e}$). Em vermelho autofluorescência inerente a microalga ($\mathbf{c} \in \mathbf{f}$). Observação em microscópio confocal Leica.



Figura 4.28: Marcação de lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* cultivados na condição *Sem fosfato* com 8 dias. Observação das células das células em campo claro ($\mathbf{a} \in \mathbf{d}$). Observação dos lipídeos neutros, marcados com *Nile red*, em amarelo ($\mathbf{b} \in \mathbf{e}$). Em vermelho autofluorescência inerente a microalga ($\mathbf{c} \in \mathbf{f}$). Observação em microscópio confocal Leica.



Figura 4.29: Marcação de lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* cultivados na condição *Com fosfato* com 19 dias. Observação das células das células em campo claro (\mathbf{a} , $\mathbf{d} \in \mathbf{g}$). Observação dos lipídeos neutros, marcados com *Nile red*, em amarelo (\mathbf{b} , $\mathbf{e} \in \mathbf{h}$). Em vermelho autofluorescência inerente a microalga (\mathbf{c} , $\mathbf{f} \in \mathbf{i}$). Observação em microscópio confocal Leica.



Figura 4.30: Marcação de lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* cultivados na condição Se*m fosfato* com 19 dias. Observação das células das células em campo claro (**a**, **d** e **g**). Observação dos lipídeos neutros, marcados com *Nile red*, em amarelo (**b**, **e** e **h**). Em vermelho autofluorescência inerente a microalga (**c**, **f** e **i**). Observação em microscópio confocal Leica.



Figura 4.31: Marcação de lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* cultivados na condição *Com fosfato* com 22 dias. Observação das células das células em campo claro ($\mathbf{a} \in \mathbf{d}$). Observação dos lipídeos neutros, marcados com *Nile red*, em amarelo ($\mathbf{b} \in \mathbf{e}$). Em vermelho autofluorescência inerente a microalga ($\mathbf{c} \in \mathbf{f}$). Observação em microscópio confocal Leica.



Figura 4.32: Marcação de lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* cultivados na condição Sem fosfato com 22 dias. Observação das células das células em campo claro ($\mathbf{a} \in \mathbf{d}$). Observação dos lipídeos neutros, marcados com *Nile red*, em amarelo ($\mathbf{b} \in \mathbf{e}$). Em vermelho autofluorescência inerente a microalga ($\mathbf{c} \in \mathbf{f}$). Observação em microscópio confocal Leica.



Figura 4.33: Marcação de lipídeos neutros em *Ankistrodesmus* cultivados na condição *Fosfato adicionado* com 25 dias. Observação das células das células em campo claro (**a** e **d**). Observação dos lipídeos neutros, marcados com *Nile red*, em amarelo (**b** e **e**). Em vermelho autofluorescência inerente a microalga (**c** e **f**). Observação em microscópio confocal Leica.

Para visualizar de forma diferencial os corpos lipídicos e os grânulos de polifosfato, as células de *Ankistrodesmus*, oriundas das diferentes concentrações de fosfato no meio, foram processadas seguindo as técnicas de citoquímica de lipídeos e contrastação em bloco, respectivamente. Desta forma, os corpos lipídicos deveriam apresentar maior contraste nas amostras processadas para a citoquímica de lipídeos e os grânulos de polifosfato deveriam apresentar maior contraste ao serem processados para contrastação em bloco. Além disto, para evitar dúvidas quanto à natureza do material, os cortes não foram contrastados com uranila ou chumbo, o que ocasionou um reduzido contraste nos mesmos, porém permitiu a identificação dos grânulos e dos corpos lipídicos.

As células observadas na condição *Com fosfato* com 8 dias, apresentaram grande número de grânulos de polifosfato, como pode ser visualizado com a contrastação em bloco (**Figura 4.34**), indicando que o fosfato foi acumulado nestes e estes não foram consumidos com 8 dias. Com a citoquímica de lipídeos, os grânulos também foram observados, porém foi verificado um acúmulo de lipídeos de forma discreta em algumas células (**Figura 4.35**).

Os grânulos de polifosfato, localizaram-se preferencialmente próximos às membranas externas dos tilacóides e ao núcleo celular (**Figura 4.34 a-f** e **Figura 4.35 a-b**), porém grânulos elétron densos foram observados entre os tilacóides (**Figura 4.35 c-e setas pretas**) ou em contato direto com os tilacóides, já sem sua morfologia típica (**Figura 4.34 b** e d).

Em algumas imagens, foi possível notar que a membrana que envolve o grânulo de polifosfato parece estar em expansão (**Figura 4.34 g-h**). Além disto, também se verifica que alguns grânulos parecem estar em contato (**Figura 4.34 i-j**) e muitos são observados em formato de "meia lua" (**Figura 4.34 k** e l e **Figura 4.35 b** e f), com um conteúdo elétron lucente junto ao grânulo. Já entre as membranas tilacóides verifica-se um material elétron lucente, que corresponde ao amido.

Ainda com 8 dias, a condição *Sem fosfato* demonstrou um maior acúmulo de lipídeos que na condição controle e no interior dos grânulos de polifosfato se observa o acúmulo de um material menos elétron denso (**Figura 4.36 a - setas brancas**). Também foram observados grânulos entre as membranas tilacóides (**Figura 4.36 a - setas pretas**). O núcleo celular (N) encontra-se em um pólo da célula (**Figura 4.36 b**), além de um Complexo **de** Golgi ocupando grande parte do volume da célula (**Figura 4.36 b** e **c**).

Após 23 dias, a condição *Com fosfato* (contrastação em bloco) ainda apresentava grande número de grânulos de polifosfato (**Figura 4.37 a-b**), porém foi verificado o aumento do conteúdo elétron lucente dentro da região de membrana do grânulo de polifosfato (**Figura 4.37 c-h**) e uma redução do material elétron denso do grânulo. Com a citoquímica de lipídeos foi possível notar que ainda existiam grânulos nas células (**Figura 4.38 –a e b**) e que estes localizavam-se próximos aos corpos lipídicos (**Figura 4.38 d**). Além disto, os corpos lipídicos ocupam grande parte do volume da célula (**Figura 4.38 c e d**).

A condição *Sem fosfato*, com 23 dias (citoquímica de lipídeos) demonstrou que há um grande acúmulo lipídico, visto que este ocupa grande parte do volume da célula (**Figura 4.39 a e b**). Além disto, foi possível notar que resíduos dos grânulos de polifosfato aparecem como regiões mais elétron densas envolvendo parte dos corpos lipídicos (**Figura 4.39 c**). Assim como foi observado no oitavo dia de cultivo, há a notória presença de um complexo de Golgi bastante evidente na célula entre o núcleo e os tilacóides (**Figura 4.39 d**).

Sete dias após a adição de fosfato no meio foi observado que os grânulos de polifosfato foram restabelecidos em *Ankistrodesmus*, apresentando-se com formato arredondado e em contato direto com os corpos lipídicos (**Figura 4.40 a-e**). Quando estes foram avaliados na ausência de ósmio, ou seja, por contrastação em bloco, foi possível observar que o interior destes grânulos apresentava um padrão de "fingerprint" (**Figura 4.40 g**) semelhante ao que é observado em corpos lipídicos, indicando que o material contido no interior dos corpos de polifosfato são de natureza lipídica. Além disto, pode-se observar que os grânulos parecem estar em contato direto, visto que um grânulo parece estar em projeção, em direção ao outro grânulo, que parece ter sua morfologia alterada devido a existência desta interação (**Figura 4.40 f**).

A observação deste mesmo material processado para a citoquímica de lipídeos indicou a natureza lipídica dos corpos que ocupam grande parte do volume celular (**Figura 4.41 a-f**). Além disto, veriifca-se a presença de material elétron denso em torno destes corpos lipídicos, bem evidenciado em (**Figura 4.41 e**). Em **Figura 4.41 c e d,** observa-se uma projeção da parede celular, em uma célula que parece estar em divisão devido a presença de duas paredes, sendo uma proveniente da célula mãe e outra da célula filha.





Figura 4.34: Observação dos grânulos de polifosfato por microscopia eletrônica de transmissão em células de *Ankistrodesmus* na condição *Com fosfato* com 8 dias de cultivo após técnica de contrastação em bloco. Observa-se que os grânulos de polifosfato, que são mais elétron densos, localizam-se próximos aos tilacóides e ao núcleo celular (**a-f**). Observa-se uma membrana envolvendo o grânulo de polifosfato e esta parece estar em expansão (**g-h**), além disto também se verifica que os grânulos parecem estar muito próximo ou mesmo em contato (**i-j**) e muitos são observados em formato de meia lua (**k-l**). Verifica-se entre as membranas tilacóides um material elétron lucente, que corresponde ao amido O material não sofreu contrastação após o preparo dos cortes e foi observado em microscópio Zeiss EM 900.





Figura 4.35: Observação dos grânulos de polifosfato por microscopia eletrônica de transmissão em células de *Ankistrodesmus* na condição *Com fosfato* com 8 dias de cultivo após técnica de Citoquímica de lipídeos (Ósmio-Imidazol).Observa-se que os grânulos de polifosfato (setas brancas) estão localizados próximos aos tilacóides (**a-b**) e alguns grânulos são observados entre os tilacóides (setas pretas em **c**, **d** e **e**). Alguns grânulos apresentam formato de meia lua com em **b** e **f**. Um material de eletron densidade semelhante a dos grânulos é observados nas células e estão indicandos como L. É possível notar que alguns corpos lipídicos parecem estar em contato, como visualizado na região central, bem como estes parecem estar fusionados como se observa na parte inferior da imagem (**d**) Verifica-se entre as membranas tilacóides um material elétron lucente, que corresponde ao amido. O material não sofreu contrastação após o preparo dos cortes e foi observado em microscópio Zeiss EM 900.



Figura 4.36: Observação dos grânulos de polifosfato por microscopia eletrônica de transmissão em células de *Ankistrodesmus* na condição Sem *fosfato* com 8 dias de cultivo após técnica de Citoquímica de lipídeos (Ósmio-Imidazol). Observa-se que os grânulos de polifosfato (setas brancas) estão localizados próximos aos tilacóides e em seu interior se observa um conteúdo menos eletron denso (**a**). Alguns grânulos de polifosfato são observados entre os tilacóides (setas pretas). O núcleo celular encontra-se em pólo da célula e está indicado como N. Além de se verificar um material elétron lucente, entre os tilacóides, correspondente ao amido, e também se observa um complexo de Golgi (**b** e **c**). O material não sofreu contrastação após o preparo dos cortes e foi observado em microscópio Zeiss EM 900.





Figura 4.37: Observação dos grânulos de polifosfato por microscopia eletrônica de transmissão em células de *Ankistrodesmus* na condição Com *fosfato* com 23 dias de cultivo após técnica de contrastação em bloco. Observa-se que mesmo após 23 dias de cultivo os grânulos de polifosfato estão presentes, como se verifica nas regiões mais elétron densas. Parte deste material é perdido durante o preparo dos cortes como pode se verificar em **a** e **b**. Os grânulos apresentam material elétron denso nas bordas e em seu interior se observa um conteúdo menos eletron denso (**c**- **h**). Além disto, em algumas imagens verificamos apenas uma linha mais eletron densa, indicando a presença de uma membrana, com material mais elétron denso (**d**- **f**), indicando que este era um possível grânulo de polifosfato, mas que agora contém novo material. Em **g** e **h**, estão evidenciados a presença de parte do grânulo e parte do conteúdo menos elétron denso. Amido pode ser verificado como material eletron lucente em algumas regiões da célula. O material não sofreu contrastação após o preparo dos cortes e foi observado em microscópio Zeiss EM 900.



Figura 4.38: Observação dos grânulos de polifosfato por microscopia eletrônica de transmissão em células de *Ankistrodesmus* na condição Com *fosfato* com 23 dias de cultivo após técnica de Citoquímica de lipídeos (Ósmio-Imidazol). Observa-se que mesmo após 23 dias de cultivo os grânulos de polifosfato estão presentes, como se verifica nas regiões mais elétron densas, bem como uma grande quantidades de corpos lipídicos. Reeconstrução de células onde pode-se observar que ainda existem grânulos de polifosfato e um acúmulo lipídico (**a** e **b**). Em **d**, observa-se o resíduo de um grânulo de polifosfato em torno do corpo lipídico. Amido pode ser verificado como material eletron lucente em algumas regiões da célula. O material não sofreu contrastação após o preparo dos cortes e foi observado em microscópio Zeiss EM 900.



Figura 4.39: Observação dos grânulos de polifosfato por microscopia eletrônica de transmissão em células de *Ankistrodesmus* na condição Sem *fosfato* com 23 dias de cultivo após técnica de de Citoquímica de lipídeos (Ósmio-Imidazol). Não são visualizados grânulos de polifosfato (a e b), porém é possível notar uma região mais elétron densas em torno de um corpo lipídico (c), bem como uma grande quantidades de corpos lipídicos (**a**, **b** e c) ocupando grande parte do volume da célula. Em **d**, observa-se um Complexo de Golgi bastante evidente entre o núcleo e os tilacóides. O amido pode ser verificado como material elétron lucente em algumas regiões da célula. O material não sofreu contrastação após o preparo dos cortes e foi observado em microscópio Zeiss EM 900.





Figura 4.40: Observação dos grânulos de polifosfato por microscopia eletrônica de transmissão em células de *Ankistrodesmus* na condição Fosfato adicionado com 23 dias de cultivo após técnica de contrastação em bloco. 7 dias após a adição de fosfato no meio, verifica-se que os grânulos de polifosfato foram restabelecidos. Estes parecem estar em contato direto com os corpos lipídicos (**a**-**e**) e também com outros grânulos de polifosfato. Sem a presença de Ósmio, foi possível observar que o interior destes grânulos continham um padrão de "fingerprint" (**g**) semelhante ao que é observado em corpos lipídicos, indicando que o material contido no interior dos corpos de polifosfato é de natureza lipídica. Além disto, pode-se observar que os grânulos parecem estar em contato direto, visto que um grânulo parece estar em projeção em direção ao outro grânulo, que parece ter sua morfologia alterada devido a presença desta interação (**f**). O amido aparece como material mais elétron lucente nas células. O material não sofreu contrastação após o preparo dos cortes e foi observado em microscópio Zeiss EM 900.



Figura 4.41: Observação dos grânulos de polifosfato por microscopia eletrônica de transmissão em células de *Ankistrodesmus* na condição Fosfato adicionado com 23 dias de cultivo após técnica de Ósmio Imidazol. Nota-se que as células apresentam uma grande quantidade de corpos lipídicos, em que estes ocupam grande parte do volume celular (**a-f**). Além disto, veriifca-se a presença de material elétron denso em torno destes corpos lipídicos, bem evidenciado em (**e**). Em c e d, observa-se uma projeção da parede celular, em uma célula que parece estar em divisão devido a presença de duas paredes, sendo uma proveniente da célula mãe e outra da célula filha. O amido aparece como material mais elétron lucente nas células. O material não sofreu contrastação após o preparo dos cortes e foi observado em microscópio Zeiss EM 900.

4.16 ANÁLISE QUALITATIVA DOS ÉSTERES METILADOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE *ANKISTRODESMUS* POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Ao utilizar a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para analisar a variação qualitativa de 38 dos ésteres metilados de ácidos graxos nas amostras de *Ankistrodesmus*, foi possível observar que 22 foram detectados em todas as condições experimentais analisadas (**Tabela 4.2**), em pelo menos um tempo amostral. Além destes, 2 ácidos graxos foram detectados somente na condição *Sem fosfato*, sendo eles C17:1 e C20:2, e o ácido graxo C21, que esteve presente na condição *Com fosfato* e *Sem fosfato*, não sendo detectado apenas na condição de *Fosfato adicionado*. Os 3 ácidos graxos detectados de maneira diferenciada correspondem aos ácidos graxos minoritários nas amostras.

A maior variação dos ácidos graxos ocorreu de forma quantitativa e teve maior influência na produção do ácido graxo saturado C16 (Palmítico) e no monoinsaturado C18:1 (Oléico) (**Tabela 4.3**). Foi verificado que na ausência de fosfato no meio, ocorre inicialmente um redução do C16 (Palmítico) após 8 dias de cultivo, porém ao completar 16 dias de cultivo, observa-se um aumento do mesmo. Assim sendo, com 16 dias foram detectados 34,4 mg/g de C16 no tratamento *Sem fosfato*, enquanto que na condição controle (*Com Fosfato*) apenas 20,1 mg/g. Mesmo após 26 dias de cultivo, este mantém valores similares 35,8 mg/g e 21,9 mg/g, nas condições *Sem fosfato* e *Com fosfato*, respectivamente. Entretanto, ao adicionar fosfato no meio após 16 dias de cultivos, notase que a quantidade deste ácido graxo volta a ser reduzida (21,6 mg/g) 10 dias após a adição do mesmo (**Tabela 4.3**).
Ácido graxo	Com fosfato	Sem fosfato	Fosfato adicionado	
C10 (Cáprico)	-	-	-	
C11	-	-	-	
C12 (Laúrico)	-	-	-	
C13	-	-	-	
C14 (Mirístico)	X	Х	Х	
C15	Х	Х	Х	
C15:1 (Δ^{10})	-	-	-	
C16 (Palmítico)	Х	Х	Х	
C16:1 (Δ^7)	Х	Х	Х	
C16:1 (Δ^9) (Palmitoléico)	Х	Х	Х	
C16:3 $(\Delta^{4,7,10})$	Х	Х	Х	
C16:3 ($\Delta^{7,10,13}$)	Х	Х	Х	
C16:5	X	X	X	
C17 (Margárico)	X	X	X	
$C17.1 (\Lambda^{10})$	-	X	-	
C18 (Esteárico)	X	X	Х	
$C18(1)^{9Z}$ (Oléico)	X	X	X	
$C18.1 (\Lambda^{9E})$ (Eláidico ou transoléico)	X	X	X	
$C18.2 (\Lambda^{9Z, 12Z})$ (Linoléico)	X	X	X	
$C18.2$ ($\Lambda^{9E,12E}$) (Linoleláidico)	-	-	-	
$C18:3(\Lambda^{6,9,12})$ (y-linolênico)	X	X	X	
$C18:3 (\Lambda^{9,12,15}) (q-L inolênico)$	X	X	X	
C18:5	X	X	X	
C20 (Araquídico)	X	X	X	
$C_{20}(1)$	X	X	X	
$C20.1 (\Delta^{-1})$ $C20.2 (\Lambda^{11E,14E})$	-	X	-	
$C20.2(\Delta^{8,11,14})$	_	A		
$C20.3 (\Delta^{-1})$	_	_	_	
$C_{20.5}(\Lambda^{5,8,11,14,17})$	-	-	-	
$C_{20.3}(\Delta)$	- V	- V	-	
C22 (Bahâniaa)			- V	
C_{22} (Deficienco)				
$C_{22.1}(\Delta)$	Λ	Λ	Λ	
$C_{22,2}(\Delta^{+})$	-	-	-	
$C22:0(\Delta^{(1)})$	-	-	-	
	-	-	-	
C24 (Lignocérico)	Х	Х	Х	
$C24:1 (\Delta^{13})$	-	-	-	
C26	Х	Х	Х	

Tabela 4.2: Variação qualitativa dos ácidos graxos em Ankistrodesmus nas diferentescondições de cultivo (Com fosfato, Sem fosfato e Fosfato adicionado).

Já o ácido graxo monoinsaturado C18:1 (Oléico), apresentou diferença significativa a partir do 16° dia de cultivo, quando efetuada a comparação entre a condição controle *Com fosfato* e o tratamento *Sem fosfato* (10,2 e 37,5 mg/g, respectivamente) (**Tabela 4.3**). No 26° dia, as diferenças entre o controle e o tratamento se mantiveram elevadas, observando-se valores de 18,6 e 52,9 mg/g. Nota-se que 10 dias após a adição de fosfato no meio houve uma redução significativa do C18:1, onde o mesmo apresentou valores de 16,1 mg/g, sendo este semelhante ao observado na condição controle.

Dos 38 ácidos graxos analisados apenas cinco correspondem a, no mínimo, 80% do total analisado nos extratos brutos lipídicos em todas as condições experimentais. Sendo estes, em ordem decrescente, C18:3 (γ -linolênico), seguido do C18:1 (Oléico), C16 (Palmítico), C18:2 (9,2) (Linoléico) e C16:5 (**Figura 4.42**). Dentre estes ácidos graxos, o C16 (Palmítico) e o C18:1 (Oléico) apresentaram menores porcentagens na condição experimental *Com fosfato* e maiores na condição S*em fosfato* (**Figura 4.43**). Além disto, após a adição de fosfato no cultivo, houve redução destes. Já os ácidos graxos C16:5 e C18:3 apresentaram comportamento inverso, com maiores porcentagens na presença de fosfato (condição controle) e aumento com a adição de fosfato. O ácido graxo C18:2 (Linoléico) também apresentou maiores porcentagens com a presença de fosfato no meio, porém esta diferença foi significativa após 20 dias de cultivo e ao adicionar fosfato também se verifica uma aumento deste ácido graxo (**Figura 4.43**).

Ácidos graxos (mg/g)	Dia 0	Dia 8		Dia 16		Dia 26		
	COM P	COM P	SEM P	COM P	SEM P	COM P	SEM P	P ADD
C16 (Palmítico)	19,1	20,3	15,9	20,1	34,4	21,9	35,8	21,6
C16:3 ($\Delta^{4,7,10}$)	2,8	1,6	1,1	3,5	1,2	2,6	1,3	1,3
C16:3 ($\Delta^{7,10,13}$)	2,2	2,3	2,1	2,0	3,6	1,9	5,8	3,3
C16:5	10,2	8,9	6,3	12,0	6,6	7,5	7,0	7,8
C18 (Esteárico)	1,1	2,8	1,6	3,0	3,1	1,4	5,4	1,0
C18:1 (Δ^{9Z})(Oléico)	12,8	11,1	13,6	10,2	37,5	18,6	52,9	16,1
C18:1 (Δ^{9E}) (Eláidico ou transoléico)	0,5	1,0	1,2	1,1	0,9	1,3	0,6	0,9
C18:2 (Δ ^{9Z, 12Z}) (Linoléico)	5,5	5,3	4,6	9,5	13,6	11,6	8,9	10,1
C18:3 ($\Delta^{6,9,12}$) (γ -linolênico)	76,7	61,6	48,7	73,9	58,4	66,5	71,7	62,5
C18:5	5,1	5,0	6,4	7,6	10,3	7,7	10,5	9,2
C20:1 (Δ ¹¹)	0,00	0,2	0,8	0,00	2,0	0,4	2,8	0,6
C24 (Lignocérico)	5,7	5,8	4,8	4,9	3,0	5,7	3,5	5,50

Tabela 4.3: Variação dos lipídeos majoritários detectados na microalga *Ankistrodesmus* nas diferentes condições de cultivo (*Com fosfato, Sem fosfato e Fosfato adicionado*) avaliados em diferentes tempos.



Figura 4.42: Variação percentual dos 12 ácidos graxos majoritários nas condições *Com fosfato, Sem fosfato e Fosfato adicionado*, ao longo de 26 dias de cultivo. A adição de fosfato foi realizada no 16° dia de cultivo. A presença de fosfato promoveu aumento percentual de C16:5, C18:3 e C18:2 e sua ausência no meio induziu aumento do C18:1.



Figura 4.43: Variação percentual dos 5 ácidos graxos majoritários que compõem 80% dos ésteres graxos lipídeos analisados em *Ankistrodesmus* nas diferentes condições de cultivo.



Figura 4.44: Análises da variação dos ácidos graxos Saturados (SAT), MUFAS e PUFAS em cada condição experimental *Com fosfato* (C), *Sem fosfato* (-P) e *Fosfato adicionado* (+P) (A) e análise temporal dos grupos (B). As diferenças foram significativas entre as condições experimentais grupos (F(8, 18)) = 107,62; P<0,01) com maior tendência de variação nos MUFAS *Sem Fosfato* (A, -P_MUFA) e na análise ao longo do tempo observa-se o aumento a partir do oitavo dia. (F(5,90)) = 19,95; P<0,01).

A

comportamento inverso, com maiores porcentagens na condição com fosfato e aumento após a adição de fosfato no cultivo. Ao analisar estatisticamente os Saturados, MUFAS e PUFAS obtidos das 3 diferentes condições (*Com fosfato, Sem Fosfato e Fosfato adicionado*) foram observadas diferenças significativas entre os grupos (F(8, 18)) = 107,62; P<0,01). A maior tendência de variação ocorreu no grupo dos MUFAS sem fosfato (**Figura 4.44A**).

Ao analisar temporalmente todos os grupos reunidos (MUFAS, PUFAS e SATURADOS nas condições *Com fosfato*, *Sem fosfato* e *Fosfato adicionado*) ao longo dos 26 dias, verificou-se um aumento dos ácidos graxos a partir do dia 08 (F(5,90)) = 19,95; P<0,01) (**Figura 4.44 B**)

Nas análises individuais de Saturados, MUFAS e PUFAS ao longo do tempo (**Figura 4.45A**) os MUFAs apresentaram um aumento significativo na condição *Sem fosfato* (F (40, 90))= 4,33; p<0,01), bem como os Saturados. Com a adição de fosfato ocorreu redução significativa dos MUFAS e Saturados e as quantidades de ácidos graxos atingem quantidades semelhantes às observadas na condição controle (*Com Fosfato*). Já os PUFAS não apresentaram variação significativa entre os tratamentos. Dentre os ácidos graxos saturados majoritários, aqueles que apresentaram maior variação nos MUFAS foi o Palmítico.



Figura 4.45: Variação dos ácidos graxos saturados, MUFAS e PUFAS ao longo do tempo de 26 dias.

B

A



5. DISCUSSÃO

5.1 ULTRAESTRUTURA DAS LINHAGENS DE CLOROFÍCEAS

Com as análises por microscopia óptica pode-se observar a morfologia característica dos gêneros *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium* e *Scenedesmus*, com a apresentação de estruturas morfológicas previamente descritas (Bortolini *et al.*, 2010; Biolo *et al.*, 2009; Bicudo e Menezes, 2006; Hegewald, 1997). Entretanto, o uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu a observação de estruturas ainda não descritas em *Ankistrodesmus* e *Scenedesmus*, onde se verifica uma fina estrutura ou filamento partindo das extremidades das células (**Figura 4.4** e **4.6**). Além disto, foram observadas em *Ankistrodesmus* células com a superfície externa da parede celular lisa e outras com pequenas fibrilas, que se assemelham à presença de polissacarídeos e algumas células com invaginações. Já as células de *Monoraphidium*, apresentaram uma superfície lisa com a observação de estruturas semelhantes às costelas observadas em *Scenedesmus* (Hentschke e Torgan, 2010; An *et al.*, 1999.)

Os filamentos que partiam das extremidades das células mais externas ao cenóbio de Scenedesmus se apresentavam em número de, pelo menos três, enquanto que em Ankistrodesmus foi verificado apenas um filamento. Já os filamentos que deixavam as células mais internas do cenóbio de Scenedesmus se apoiavam sobre as células vizinhas, permitindo uma ligação entre estas. Poucos trabalhos com microscopia eletrônica de varredura mostram finos filamentos partindo da extremidade das células e os recentemente publicados descrevem como cerdas em Pectinodesmus holtmannii linhagem Krienitz 2005-5 (Hegewald et al., 2013) e como microtúbulos em Desmodesmus (Valdez-Ojeda et al., 2015). Existe um maior número de trabalhos mostrando a estrutura da parede da microalga Scenedesmus, entretanto em classificações mais recentes esta foi classificada como Desmodesmus (Moresco e Bueno, 2007; Hegewald, 2000). A presença de espinhos nas células externas e intermediárias do cenóbio, juntamente com estudos genéticos, definiram a transferência das espécies de Scenedesmus que apresentavam espinhos para o gênero Desmodesmus An Friedl e Hegewald (Hegewald, 2000; Bicudo e Menezes, 2006; Moresco e Bueno, 2007). Entretanto, no presente trabalho, Scenedesmus apresentou estruturas que partem das extremidades das células, semelhantes a finos espinhos, que ainda não haviam sido descritas neste gênero.

Vale ressaltar que o uso da MEV nas observações de *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus* e *Monoraphidium* permitiu a visualização e preservação destas estruturas de diminuto tamanho e difícil observação por microscopia óptica, que é frequentemente usada nas identificações. Mesmo a utilização da microscopia eletrônica de transmissão (MET) talvez tornasse mais difícil a identificação destas, enfatizando a necessidade de mais trabalhos com MEV na observação de estruturas externas das microalgas.

O gênero *Scenedesmus* tem uma grande plasticidade morfológica, que levou os ficólogos a descreverem 1.300 táxons específicos e infra-específicos (Hegewald e Silva 1988; Hegewald e Wolf, 2003). Apesar do polimorfismo que muitas microalgas podem apresentar, a observação destas por MEV, é fundamental na compreensão destes organismos, bem como para a sua classificação. No passado, a classificação se baseava majoritariamente em observações morfológicas, nutrientes acumulados, pigmentos e constituição de parede celular, o que causava muita divergência em táxons que dividiam características morfológicas comuns ou que tinham grande plasticidade fenotípica (Trainor *et al.*, 1990; Kessler *et al.*, 1997; Trainor, 1998). Wozniak e colaboradores (2008) sugeriram que metodologias diferentes deveriam ser aplicadas de forma combinada para que houvesse uma maior compreensão destes táxons. Atualmente, as ferramentas da biologia molecular, têm sido bastante utilizadas no esclarecimento das espécies, bem como em suas origens evolutivas (Leliart *et al.*, 2012). Esta análise associada à MEV auxilia na classificação das espécies, bem como na descrição das mesmas.

Desta forma, a identificação da linhagem de trabalho como *Ankistrodesmus stipitatus*, somada às observações de estruturas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura ampliam o conhecimento não apenas com a definição do gênero, mas identificando as mesmas como espécie e apresentando estruturas até então não descritas.

A espécie *Ankistrodesmus stipitatus* (Chodat) Komárková- Legnerová já foi verificada no Brasil em levantamento taxônomico realizado no Rio São João, Paraná, Brasil (Bortolini *et al.*, 2010). Neste material examinado com auxílio de um microscópio óptico, a descrição das células incluía a formação de cenóbios com apenas duas células, fusiformes, uma delas mais arcada, outra mais reta, ápices afilados, unidas uma a outra pela região central das células, cloroplasto único e parietal, sem pirenóides, parede celular lisa. Estas apresentaram comprimentos de 31,9-39 μm, e largura de 1,6-2 μm.

O material aqui examinado, com auxílio de um microscópio eletrônico de varredura, foi proveniente de células de *Ankistrodesmus* mantidas em cultivos em laboratório, portanto existem possíveis variações morfológicas relativas à plasticidade fenotípica da própria linhagem. Sendo assim, em sua maioria, as células aqui apresentadas por microscopia óptica e eletrônica de varredura, eram solitárias. Entretanto, foram verificados cenóbios, principalmente logo após o processo de duplicação celular. A parede celular lisa também foi observada por MEV, porém fibrilas foram verificadas cobrindo a parede celular, ressaltando a visualização de estruturas que não podem ser observadas com a microscopia óptica.

5.2 DETECÇÃO DE LIPÍDEOS NEUTROS NAS CLOROFÍCEAS

Durante a seleção da linhagem de trabalho, foi verificado que as linhagens apresentaram uma redução na quantidade de lipídeos neutros nos três primeiros dias de cultivo. O acúmulo lipídico observado está descrito na literatura para diferentes gêneros de microalgas, mostrando que inicialmente ocorre um aumento em número de células, com uma concomitante redução na quantidade de lipídeos por célula, seguido de um acúmulo de lipídeos (Wu *et al.*, 2015). Em estudos anteriores, foram mostrados os comportamentos inversos entre divisão celular e acúmulo lipídico, onde o conteúdo dos TAGs aumenta significativamente quando o crescimento da microalga chega à fase estacionária (Levitan *et al.*, 2014; Rodolfi *et al.*, 2009; Sheehan *et al.*, 1998). A redução quantitativa nos lipídeos acumulados sob a forma de triacilglicerol em corpos lipídicos durante a fase exponencial de crescimento também pode estar relacionada com o gasto energético para formação de novas células, utilização destes para o metabolismo de manutenção das células em ambientes com redução na temperatura, bem como na formação de membranas (Cohen *et al.*, 2000).

Sabe-se que a duração do cultivo (tempo de cultivo) também pode afetar significativamente a produtividade lipídica (Mandal e Mallick, 2009). Como as células usadas como inóculo no experimento piloto eram provenientes de um meio com 17 dias de crescimento, é possível que este inóculo já se encontrasse em fase estacionária. Isto justificaria a maior detecção de lipídeos, no início do experimento piloto, que ao final com 15 dias.

Em revisão publicada recentemente (2016), Yee relatou o uso de linhagens da família Selenastraceae (*Ankistrodesmus*, *Monoraphidium* e *Scenedesmus*) como potenciais linhagens para produção de biodiesel devido ao acúmulo de lipídeos de

interesse. No presente trabalho, as três linhagens previamente selecionadas pertenciam aos mesmos gêneros indicados por Yee, e estas linhagens, isoladas de ambientes brasileiros, também foram capazes de acumular quantidades adequadas de lipídeos.

Apesar de as linhagens de *Ankistrodesmus* e *Scenedesmus* apresentarem quantidades de lipídeos semelhantes no início do experimento, a linhagem de *Ankistrodesmus* apresentou mais rápida retomada no acúmulo de lipídeos que *Monoraphidium* e *Scenedesmus*. Dessa forma, *Ankistrodesmus* começou a acumular lipídeos após o 7º dia de cultivo, enquanto que nas duas últimas linhagens isto ocorreu após o 11º dia.

Este acúmulo em *Ankistrodesmus* também foi confirmado ao se observar corpos lipídicos por MET após oito dias de cultivo em experimentos posteriores *Com Fosfato*. Além disto, a observação das três linhagens por microscopia confocal, mostrou que *Ankistrodesmus* apresentava marcação positiva para lipídeos neutros em quase todo o seu volume celular, enquanto as células de *Scenedesmus* apresentavam forte marcação de lipídeos, porém sem que estes ocupassem toda a célula.

Também foi considerado que as células de *Ankistrodesmus* têm um menor volume, portanto a ocupação dos lipídeos em todo o corpo celular e a retomada no acúmulo lipídico em um menor intervalo de tempo foram fatores determinantes na escolha da linhagem de trabalho. Além disto, a motivação final para a seleção da linhagem de trabalho, dentre as três clorofíceas testadas, considerou o maior acúmulo de grânulos de polifosfato nos cultivos no mesmo intervalo de tempo. Sendo assim, o maior número de grânulos de polifosfato em *Ankistrodesmus*, ocupando quase todo o comprimento celular, foi decisivo para a escolha desta linhagem para os experimentos seguintes (*Com Fosfato, Sem Fosfato* e *Fosfato adicionado*), já que estes grânulos poderiam funcionar como reserva energética ou na ativação de genes relacionados à resposta em condições de estresse (Kulaev e Kulakovskaya, 2000). Portanto, a seleção da linhagem foi apoiada no acúmulo lipídico, na velocidade no acúmulo destes, somada à detecção de um elevado número de grânulos de polifosfato.

Após a seleção da linhagem de *Ankistrodesmus* (ANRF-01) como microalga de trabalho, a mesma foi identificada como *Ankistrodesmus stipitatus* (publicada em 1969 por Komárková-Legnerová). A espécie tipo é *Ankistrodesmus fusiformis* Corda e esta foi descrita com o sinônimo heterotípico *Ankistrodesmus falcatus var. stipitatus* (Chodat) Lemmermann 1908 nos Grandes Lagos da América do Norte, na Argentina, e no estado de New South Wales na Austrália e na Nova Zelândia, como *Ankistrodesmus stipitatus*

Komárková-Legnerová na Europa (Grã-Bretanha, Alemanha, Romênia e Espanha) e na Ásia (Leste da Rússia) (Guiry e Guiry, 2017). Desta forma, novos trabalhos com interesse em acúmulo de fosfato, acúmulo de lipídeos ou mesmo com microscopias podem utilizar como referência a espécie de *Ankistrodesmus stipitatus*.

5.3 INFLUÊNCIA DO FOSFATO NO CRESCIMENTO CELULAR E BIOVOLUME MÉDIO

A limitação do elemento fosfato no meio induziu variações no biovolume celular em *Ankistrodesmus*, sendo verificado aumento em intervalos médios de três dias, seguido de uma redução ao final. Além disto, a ausência de fosfato induziu maiores biovolumes/célula que a presença de fosfato, indicando que o estresse nutricional promoveu um aumento no biovolume por célula em *Ankistrodesmus*. O aumento no biovolume pode estar relacionado com o acúmulo de lipídeos, amido ou com a presença de vacúolos. Comportamento semelhante já foi verificado em *Scenedesmus*, mantido sob condições oligotróficas, já que esta linhagem demonstrou variações no biovolume, enquanto esta não foi verificada em condições eutróficas (Wu *et al.*, 2015). Estresses nutricionais causados pela ausência de fosfato e/ou nitrogênio também mostraram afetar clorofíceas (Ferreira *et al.*, 2015; Bohnenberger e Crosseti, 2014; Mandal e Mallick, 2009) bem como diatomáceas. Em 1976, Lehmand, em um trabalho com *Pediastrium duplex* relatou que, sob privação de fósforo, houve aumento no volume celular em condições oligotróficas.

A nova entrada de fosfato aos 16 dias, no cultivo mantido sem fosfato, promoveu uma redução no biovolume celular e fez com que este se assemelhasse ao da condição *Com Fosfato*, indicando que o fosfato exerce efeito direto sobre o biovolume da célula.

Além disto, cultivos mantidos na presença de fosfato tiveram crescimento mais acelerado que cultivos na ausência deste, bem como a adição de fosfato ao 16° dia promoveu uma retomada no crescimento. Estes dados demonstram que a ausência de fosfato reduziu o crescimento, indicando que tal privação foi notada pelas células. Porém, vale ressaltar que estas ainda mantiveram seu crescimento de maneira mais lenta, indicando que o fosfato intracelular acumulado pareceu sustentar o crescimento de *Ankistrodesmus* nessas condições de cultivo.

Sabe-se que o fósforo é fundamental para a divisão celular, visto que é um elemento essencial na síntese de fosfolipídeos e de material genético, tal como DNA e RNA (Borchard e Azad, 1968; Powell *et al.*, 2009). Quando microalgas são expostas à

severa privação de fósforo, a síntese de fosfolipídeos é inibida. Esta redução também já foi verificada em outros microorganismos, como por exemplo, *Bacillus subtilis* que usam diferentes estratégias para utilizar menos fósforo em constituintes da célula, como substituição de componentes de parede como o ácido tecóico por ácido tecuróico ou mesmo substituindo fosfolipídeos de membrana por outros lipídeos não fosfatados, como, por exemplo, diacilglicerol (Merad *et al.*, 1989; Minnikin *et al.*, 1972).

Da mesma forma que em *Ankistrodesmus*, resultados da literatura com *Scenedesmus* indicam que células expostas à privação de fósforo, tiveram a divisão celular inibida gradualmente, porém as células não pararam de aumentar o seu volume celular, com aumento de biomassa seca. Vale ressaltar que neste trabalho com *Scenedesmus*, os autores utilizaram como "privação" de fósforo o uso de metade da concentração de fósforo do meio BG-11, cujo meio repleto tem 1,5 mg P/ L (Wu *et al.*, 2015). Ou seja, não foi uma privação completa, como a que *Ankistrodesmus* foi submetida no presente estudo.

Em estudos anteriores, pesquisadores encontraram que a divisão celular de microalgas e o acúmulo de lipídeos apresentam respostas antagônicas e que o conteúdo de lipídeos em microalgas, especialmente o conteúdo de TAG, aumentava significativamente quando a microalga entrava em fase estacionária (Levitan *et al.*, 2014; Rodolfi *et al.*, 2009; Sheehan *et al.*, 1998). Em *Ankistrodesmus*, o maior acúmulo lipídico ocorreu quando foram observadas menores taxas de crescimento.

5.4 INTER-RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO, CLOROFILA E FÓSFORO

A Hipótese da Taxa de Crescimento (Sterner e Elser, 2002) implica em dois preceitos básicos: (1) a taxa de formação de uma ligação peptídica por um ribossomo ocorre em uma taxa que é essencialmente fixada em diversos organismos e ambientes e (2) uma vasta massa de produção de proteína é alocada no crescimento. Então, o aumento da síntese de proteínas durante o crescimento e desenvolvimento necessita de alocação de biomassa para o RNAr rico em P, que é responsável pela síntese de proteínas. Considerando a importância e a grande biomassa protéica nas células, para manter altas taxas de crescimento celular há necessidade de abundância de ribossomos, ricos em fósforo, predizendo uma correlação positiva entre taxa de crescimento e conteúdo de fósforo. Considerando que o RNAr contém uma importante quantidade do P

intracelular, aumentos na concentração de RNAr podem influenciar desde a síntese de proteína até a proporção entre C:N:P (Flinn *et al.*, 2010).

Em condições ambientais, já foi demonstrado no Lago Michigan e Windermere que pequenas variações na concentração de fosfato promoveram a ocorrência de florações de diatomáceas, aumentos significativos na concentração de clorofila e de 30 vezes na concentração de células em suspensão. Essas variações raramente excederam $0,1\mu M$ (3mg P/m³) (Reynolds,1992a). Algumas algas planctônicas e bactérias estão adaptadas a absorver fósforo para realizar diversas duplicações celulares apesar da baixa concentração de fósforo disponível no ambiente.

Além disto, quanto menor é a concentração requerida para atingir a concentração relativa à metade da taxa máxima da absorção de fósforo, maior é a habilidade da alga de preencher esses requerimentos em concentrações externas cronicamente baixas. A capacidade de retirada do meio é mais rápida em baixas concentrações, notoriamente em níveis de subsaturação, sendo maior a afinidade pelo fósforo e, maior a habilidade para competir por fontes escassas (Reynolds, 2006).

Desta forma, experimentos realizados por Sommer (1984) distinguiam diversas estratégias adaptativas entre o fitoplâncton de água doce para lidar com fornecimentos variados de fósforo. Assim sendo, as espécies devem ser velocidade adaptadas, nos quais altas taxas de crescimento celular e duplicação coincidem com altas taxas de retirada do nutriente, ou elas devem ser adaptadas ao estoque, nos quais taxas de retirada rápidas e oportunísticas excedem taxas lentas de deposição no crescimento, permitindo um acúmulo de reserva intracelular de fósforo. Estas adaptações são distintas e ocasionadas por diferenças em taxas espécie-específicas, onde pode haver uma tendência a serem mais ou menos adaptados à afinidade.

De maneira similar, *Ankistrodesmus* demonstrou captar o fosfato dissolvido no meio de cultivo em intervalo de tempo de três dias após ter sido mantido na ausência do mesmo, indicando uma taxa de absorção mais rápida que na condição controle com intuito de reserva, já que foi verificado que corpos de polifosfato voltaram a ser mais evidentes em células onde o fosfato foi reposto no meio. Portanto, após a privação de fosfato, *Ankistrodesmus* respondeu com rápida retirada do meio, como já verificado em outras microalgas, bem como acúmulo em grânulos de polifosfato e aumento no crescimento.

5.5 VARIAÇÃO NA QUANTIDADE DE CLOROFILA

Não houve variação significativa na quantidade de clorofila por célula, indicando que a ausência de fosfato não exerceu efeito sobre a quantidade desse pigmento. Alguns trabalhos com variação da concentração de fosfato apresentam dados contrários aos aqui observados, com redução na clorofila (Wu *et al.*, 2015). É possível que esta redução na clorofila em outros organismos esteja relacionada à quantidade de fosfato intracelular estocado, onde pequenas concentrações de fosfato intracelular podem afetar a concentração de clorofila ou mesmo outros constituintes celulares.

É importante considerar que a análise dos dados como clorofila por célula foi fundamental na interpretação dos resultados, visto que se estes fossem analisados como concentração de clorofila por volume de cultura, seria verificado um aumento da mesma, que ocorre em função do aumento do número de células no meio. Entretanto, sabe-se que este aumento não é real, pois não se traduz em um aumento de clorofila por célula e sim no aumento do número de células no meio. Vale ressaltar que as células do inóculo tiveram uma aclimatação luminosa prévia aos experimentos, sendo mantidas com intensidade luminosa semelhante à usada durante os experimentos.

5.6 EFEITO DO FOSFATO NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA

O fosfato disponível no meio parece ter uma relação direta com a atividade fotossintética, já que foi verificado que na presença deste no meio a atividade fotossintética se manteve alta ou crescente por um período mais longo (até o 6° dia) quando comparado com a condição *Sem fosfato* (até o 3° dia), indicando que a presença do fosfato no meio é capaz de manter a atividade fotossintética máxima por mais tempo. Quando na ausência de fosfato, a atividade fotossintética sofreu uma redução a partir do 6° dia, enquanto que no meio *Com fosfato* esta redução na atividade fotossintética passa a ser pronunciada a partir do 12° dia.

A adição de fosfato ao meio de cultivo fez com que a atividade fotossintética fosse novamente elevada. Deve-se considerar que a adição de fosfato no 16° dia de cultivo, promove também uma nova entrada dos elementos sódio e potássio, visto que estes compõem a solução contendo fósforo. Portanto, é possível que algumas atividades celulares também sejam influenciadas pela presença destes outros elementos. Porém, deve-se considerar que a condição *Sem Fosfato* recebeu estes 2 elementos de maneira suficiente para que houvesse equivalência destes com a condição *Com Fosfato* e na

condição *Sem Fosfato*, e esta última ainda assim respondeu com redução mais rápida da atividade fotossintética.

5.7 O CONSUMO DE FOSFATO

Após um período de 16 dias de privação de fosfato, as células de *Ankistrodesmus* apresentaram uma rápida captação deste elemento, em três dias. Isto concorda com o descrito em trabalhos anteriores, onde a velocidade de captação do fosfato do meio é mais rápida após situações de privação ou redução de fosfato dissolvido (Fogg, 1973). Assim, mesmo que todo o fosfato dissolvido captado do meio não seja utilizado por estes organismos naquela etapa de crescimento, estes são armazenados em grandes quantidades, sob a forma de grânulos de polifosfato, para momentos de escassez em um comportamento de luxúria. Este fosfato intracelular é fundamental para a manutenção das atividades celulares, como por exemplo, a duplicação celular, fornecimento de energia e síntese de proteínas.

O processo de retirada de fosfóro do meio requer gasto de energia, a participação de enzimas fosfatases (ácidas ou alcalinas) e a presença de íons sódio, para que seja promovido um efeito específico de aumentar a retirada do fósforo do meio e da incorporação deste em compostos orgânicos. Assim, é possível que a entrada de sódio junto ao fosfato também tenha auxiliado na rápida captação do fosfato após privação prolongada.

Na condição onde o fosfato dissolvido esteve presente desde o início do cultivo, este foi consumido lentamente do meio até atingir os limites mínimos detectáveis indicando que as reservas de fosfato interno foram lentamente repostas pelo fosfato dissolvido no meio, indicando velocidades mais lentas de captação de fosfato, que pode estar relacionado à atividade das enzimas envolvidas no processo de captação. Essas podem estar em atividade mais lenta e podem variar também conforme o consumo intracelular.

Após a privação de fosfato no cultivo, a captação deste do meio e o acúmulo intracelular foram confirmados com a redução do fosfato dissolvido e com o reaparecimento dos grânulos de polifosfato intracelulares, respectivamente. As observações por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram o comportamento de luxúria em *Ankitrodesmus*.

A manutenção destes grânulos parece estar vinculada a uma estratégia energética, já que a energia potencial contida nas ligações fosfoanidras são altamente energéticas e semelhantes à energia fornecida pelo ATP (Achbergerová e Nahalká, 2011).

5.8 A DINÂMICA NO ACÚMULO DE GRÂNULOS DE POLIFOSFATO

O fosfato captado do meio pode ser acumulado intracelularmente sob a forma de grânulos de polifosfato, cuja organela tem caráter acídico (Lander *et al.*, 2016). Estes grânulos foram evidenciados na microalga *Ankistrodesmus* com o uso dos diferentes marcadores com afinidade por compartimentos ácidos.

O marcador DAPI, por exemplo, é muito usado na detecção do núcleo, porém já foi demonstrado que este tem a emissão em um comprimento de onda ligeiramente maior para a detecção dos grânulos de polifosfato, ou seja, acima de 500 nm neste último (Ramos *et al.*, 2010). Esta marcação também foi aqui verificada na microalga *Ankistrodesmus*. Já a marcação com *Lysotracker green* apresentou marcação dos grânulos em todo o comprimento celular em amarelo, devido ao somatório das cores vermelho, da autofluorescência proveniente da clorofila, com a cor verde do marcador. Nas extremidades das células, onde não foi verificada a autofluorescência da clorofila, foi possível observar os grânulos em verde.

Achados de que as organelas relacionadas com lisossomos (*lysosome related organele - LRO*) e acidocalcissomos compartilham o sistema de marcação de proteínas de membrana reforçam semelhanças entre essas organelas (Besteiro *et al.*, 2008), apoiando a hipótese de que LRO e acidocalcissomos são biogenicamente relacionados.

Os marcadores de compartimentos ácidos usados nas células de *Ankistrodesmus* evidenciaram a distribuição dos grânulos ao longo de todo o comprimento celular, exceto na região central da célula, onde está localizado o núcleo. Esta distribuição foi confirmada ao observar as células por microscopia eletrônica de transmissão. A observação dos grânulos de maneira alinhada em *Ankistrodesmus* parece confirmar uma suspeita de Docampo e colaboradores (2001), que também relatam a possível conexão desses grânulos com algum elemento do citoesqueleto. Além disto, os autores também citam a existência de contato entre acidocalcissomos e núcleo, inclusões lipídicas, mitocôndrias e microtúbulos subpeliculares encontrados em protozoários da família Trypanosomatidae. Os grânulos de polifosfato também foram observados junto a corpos lipídicos em *S. cerevisae* (Kulakovskaya *et al.*, 2014).

5.9 A RELAÇÃO ENTRE OS GRÂNULOS DE POLIFOSFATO E LIPÍDEOS NEUTROS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Grânulos elétron densos, semelhantes aos de polifosfato foram detectados nas 3 linhagens das microalgas *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* e *Monoraphidium* observados em células inteiras com 17 dias de cultivo. Nessa primeira avaliação dos grânulos elétron densos, *Monoraphidium* e *Ankistrodesmus* apresentaram grânulos com morfologia bem definida, com formato esférico, enquanto que *Scenedesmus* apresentou o material elétron denso com forma irregular e outros com forma esférica.

Além disto, *Ankistrodesmus* apresentou maior número de grânulos que as outras linhagens de microalgas avaliadas; estes tinham formas geralmente esféricas (com circularidade de 0,97, sendo 1 o valor para uma esfera perfeita), com alguns grânulos em forma de meia lua e/ou com conteúdo elétron lucente no centro do mesmo. A morfometria realizada apenas nesta linhagem indicou um número médio de 76 grânulos, com aproximadamente 286 nm de diâmetro e 1,37 nm³ de volume, indicando que estes correspondem a um grande acúmulo de fosfato intracelular. Outros organismos, como cianobactérias, demonstraram ter um pequeno número de grânulos em seu interior (Jensen, 1969), entretanto outros organismos como o protozoário *Leishmania* pode conter um grande número destes. No tripanossomatídeo *Phytomonas françai* foram observados em média 208 organelas elétron densas espalhadas por toda a célula, entretanto em contraste com outros parasitas estudados até aquele momento, as organelas não eram esféricas, e tinham um formato alongado (Miranda *et al.*, 2004).

Em 2005, Docampo e colaboradores relataram que o número de acidocalcissomos varia de espécie para espécie e entre os estágios de desenvolvimento da mesma espécie, onde formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* têm mais acidocalcissomos que as formas epimastigotas ou tripomastigotas, sendo a primeira em torno de 40 grânulos distribuídos por toda a célula. Além disto, um estudo morfométrico em tripanosomatídeos mostrou que, embora o número e o tamanho dos acidocalcissomos varie, o volume da célula ocupado por eles fica em torno de 2%. O tamanho da organela parece ser inversamente proporcional ao número de organelas presentes, onde são geralmente mais largos quando estão presentes em um pequeno número, e estes são de pequenos tamanho quando presentes em grande número (Miranda *et al.*, 2004).

A morfologia de meia lua ou elétron lucente de alguns grânulos observados nas células inteiras de *Ankistrodesmus* parecem estar relacionadas ao consumo de fosfato

intracelular, já que estes grânulos tem seu conteúdo elétron denso reduzido e este passa a ser substituído por conteúdo elétron lucente ao longo do tempo de cultivo, conforme visualizado nos cortes. Além disto, as alterações na morfologia dos grânulos parecem depender das condições nutricionais do meio de cultivo, como a disponibilidade de fosfato dissolvido e da etapa de crescimento em que as células se encontram.

Células de *Ankistrodemus* observadas após a reposição de fosfato dissolvido no meio tiveram seus grânulos restabelecidos, porém a morfologia destes parece sofrer influência do material elétron lucente que está em contato com o grânulo.

Em 1969, Jensen realizou estudos com os grânulos de polifosfato na cianobactéria *Plectonema boryanium* e relatou a presença de uma região central mais clara no interior dos grânulos de polifosfato. Ele também relata que diferentes imagens dos polifosfatos podem ser obtidas dependendo do estágio de desenvolvimento, sugerindo variações morfológicas dos grânulos conforme a etapa de crescimento.

Ao analisar a composição de elementos dos grânulos elétron densos observados em *Ankistrodesmus* foram detectados os elementos químicos carbono, oxigênio, sódio, magnésio, fósforo, potássio e cálcio. Estes dados concordam com os observados na literatura, que afirmam que tais grânulos acumulam estes elementos em seu conteúdo, especialmente fósforo e cálcio (Miranda *et al.*, 2000; 2004;Docampo e Moreno, 1999, 2001) e que estes grânulos estão presentes de forma conservada em diferentes organismos, desde bactérias até humanos (Lander *et al.*, 2016; Docampo, *et al.*, 2005). Estes grânulos, que também já foram descritos como acidocalcissomos, estão relacionados com mecanismos de detoxificação, além da função de quelante de metais (Korneberg, 1995), aumento da patogenicidade em alguns organismos, ativação de genes relacionados à condições de estresse celular, porém a função principal atribuída a estes grânulos continua relacionada à reserva energética.

Na conversão do biodiesel, um alto conteúdo de ácido oléico (C18:1) induz uma boa estabilidade da oxidação bem como propriedades de fluxo de baixa temperatura (Park *et al.*, 2008), e baixo conteúdo de ácido graxos poli-insaturados tem efeito na melhoria da estabilidade oxidativa do biodiesel. É desejável que o óleo de microalgas, para fins de produção de biodiesel, tenha menores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (com 4 ou mais duplas ligações), já que estas causam uma instabilidade oxidativa no biodiesel de microalga (Chisti, 2007).

Ankistrodesmus stipitatus apresentou como cinco ácidos graxos majoritários C18:3; C18:1; C16:0; C18:2 e C16:5, que correspondem a mais de 80% dos ácidos

graxos totais. Estes resultados concordam com dados da literatura de que muitos desses ácidos graxos fazem parte dos lipídeos acumulados em triacilgliceróis (TAGs), bem como dos lipídeos de membrana tilacóides, que apresentam grande contribuição na concentração desses. Em uma pesquisa com uma linhagem de *Ankistrodesmus falcatus* isolada na Índia e mantida sob estresse salino, foi observado que os ácidos graxos majoritários eram C16:0, C18:1 e C18:3, com um aumento de 30,5% de C18:1 na condição de estresse (Jayanta *et al*, 2012).

A privação de fosfato com a linhagem de Ankistrodesmus aqui estudada (ANRF-01) favoreceu o aumento dos ácidos graxos monoinsaturados, e concomitante redução dos poli-insaturados. Vale ressaltar que o tratamento, ou seja, a retirada de fosfato dissolvido do meio, promoveu a redução do ácido graxo majoritário, o C18:3, de 53% para 35%, aproximadamente, enquanto que o ácido graxo C18:1 teve aumento de 10% para 25%. Isto demonstra a retirada de fosfato do meio promoveu uma mudança significativa na constituição dos ácidos graxos, favorecendo a formação de ácidos graxos monoinsaturados, que são de interesse para a produção de biodiesel. Enquanto isto, o efeito inverso foi observado com a nova entrada de fosfato no meio, onde o monoinsaturado C18:1 foi reduzido e C18:3 aumentado. Isto indica que a adição de fosfato, levou à interconversão dos ácidos graxos, com provável ativação de enzimas dessaturases, cuja atividade já foi demonstrada na microalga Chlorella, quando mantida sob estresse induzido por baixa temperatura. Os genes de Chlorella, que foram ativados em baixas temperaturas, são responsáveis pela conversão de C18:1 em C18:2 e pela conversão de C18:2 em C18:3. A expressão heteróloga na levedura S. cerevisae, do gene responsável pela dessaturase de ácido graxo de Chlorella (CvFAD2) que converte C18:1 em C18:2 levou a um acúmulo de C18:2 neste organismo. Sabe-se que, quando mantidas sob condição de estresse nutricional, como a privação de fósforo, as microalgas alteram a vias de síntese de lipídeos para a formação e acúmulo de lipídeos neutros, principalmente sob a forma de triacilglicerol (Hu et al., 2008; Yang et al., 2013). Além da privação de fósforo, a privação de nitrogênio também aumenta o acúmulo de TAG/ lipídeos de microalgas (Guccione et al., 2014; Yang et al., 2013; Li et al., 2010a; Sheehan et al., 1998; Ferreira et al., 2015), porém este último exerce efeitos negativos na taxa de crescimento.

Apesar de ter apresentado um crescimento mais lento na ausência de fosfato, Ankistrodesmus stipitatus teve seu crescimento suportado pelo fosfato acumulado intracelularmente, apresentou um acúmulo lipídico maior em um menor intervalo de tempo, com favorecimento do aumento dos saturados e monoinsaturados, o que indica que esta microalga tem potencial para ser utilizada na produção de biodiesel.

Estudos com microalgas demonstram que o acúmulo de lipídeos com grande número de insaturações é espécie-específico e está fortemente relacionado com a redução da temperatura do meio de cultivo (Harwood e Guschina, 2009). Desta forma, trabalhos com *Scenedesmus obliquus*, por exemplo, demonstraram que os ácidos graxos desta espécie são principalmente saturados e monoinsaturados. Esses correspondem a aproximadamente 75% do total dos ácidos graxos, contribuindo positivamente para a estabilidade oxidativa do biodiesel extraído desta microalga clorofícea, transformando portanto esta espécie em um organismo potencial para a produção de biodiesel. A amostra consistia de quase 75% de saturado e monoinsaturado (C16:0 - 38,8%; C18:1 – 35,4%), juntamente com os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa C18:2 (10,8%) e C18:3 (15%) (Mandall e Malick, 2009).

O efeito da limitação de nutrientes na composição de ácidos graxos e lipídeos de Chlamydomonas moewusii resultou principalmente em alterações na composição dos ácidos graxos dos lipídeos do cloroplasto, fosfatidilglicerol (PG)e monogalactosildiacilglicerol (MGDG). Os ácidos graxos poli-insaturados (C16:3, C16:4 e C18:3), característicos dos galactolipídeos plastídicos e C16:1, específico de PG plastídico, diminuíram em meio limitado de nutriente. O aumento concomitante em C16:0 e C18:1 observados pode refletir a síntese de lipídeos de estoque não-polares, já que estes lipídeos predominaram em tais lipídeos de C. moewusii. A limitação de P levou a um aumento no conteúdo lipídico de P. tricornutum, Chaetoceros sp. e em P. lutheri, mas a uma redução no conteúdo lipídico em flagelados verdes, Nannochloris atomus e Tetraselmis sp. Um redução nutricional mais severa resultou em maior conteúdo relativo de palmitato e oleato e um menor conteúdo relativo de C18:4N-3, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico. Em contraste, um nível elevado de ácidos graxos insaturados em todos os lipídeos individuais analisados (fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, monogalactosildiacilglicerol, digalactosildiacilglicerol e sulfoquinovosildiacilglicerol) foi descrito em células mantidas na ausência de fósforo da alga C. kessleri. Em geral, é atualmente aceito que a limitação de fósforo causa reposição de fosfolipídeos de membrana por glicolipídeos não fosfatados e lipídeos betaína, sendo este último na bactéria fotossintetizante Rhodobacter sphaeroides (Benning et al., 1995). Este representa então um mecanismo efetivo na conservação e economia de fosfato.

Diferentes análises da presença de lipídeos foram realizadas nas amostras de *Ankistrodesmus*, sendo estas a marcação e detecção dos lipídeos neutros por fluorimetria e microscopia confocal, bem como a citoquímica de lipídeos com microscopia eletrônica de transmissão. As análises dos cultivos de *Ankistrodesmus* controle (*Com Fosfato*) por fluorimetria não apresentaram sinal de detecção de lipídeos neutros com 8 dias, porém a presença destes foi observada por microscopia confocal, onde pouco sinal foi verificado para a marcação destes com o fluorocromo *Nile red*. A presença dos corpos lipídicos também foi confirmada com a visualização por microscopia eletrônica de transmissão, que mostrou pequenos corpos lipídicos.

Em conjunto, estes resultados indicam que tanto a espectrofluorimetria, quanto a microscopia de fluorescência apresentam limitações inerentes à técnica, como o uso de um marcador de fluorescência, a emissão de sinal, a detecção pelo equipamento e o tamanho da organela a ser detectada, já que estamos trabalhando com ferramentas que dependem de emissão de um determinado comprimento de onda e intensidade mínima para que estes sejam avaliados. Estas características também dependem do tamanho da organela, o que torna a análise mais complexa e ao mesmo tempo limitante.

As diferenças de um dia entre as amostragens dos cultivos para análises por espectrofluorimetria, e por microscopia confocal não justificam as variações de resultados entre as duas técnicas, já que a microscopia de fluorescência, que forneceu mais sinal/informações, foi realizada com amostras retiradas antes. Desta forma, fica claro que a ausência de fosfato com 8 dias de cultivo afetou positivamente o acúmulo de lipídeos.

De maneira geral, o acúmulo lipídico na condição controle (com 8 dias) foi muito pequeno e não significativo. Porém, na condição *Sem Fosfato*, observamos por microscopia confoca, que já existe um acúmulo lipídico mais elevado, indicando que a ausência de fosfato exerceu efeito no acúmulo destes. Enquanto isto, a espectrofluorimetria não foi capaz de detectar diferença significativa entre estas duas condições de cultivo.

Além disto, as células apresentam grânulos de polifosfato sob a forma de meia lua e material elétron denso, semelhante ao fosfato, distribuído em todo o conteúdo celular e próximo à superfície da célula, bem como sobre as membranas tilacóides voltadas para a região citoplasmática.

Com a observação de células inteiras por microscopia eletrônica de transmissão, foi verificado que grânulos elétron densos com formato de meia lua estão presentes em *Ankistrodesmus*. Análises de cortes mostraram que um material elétron lucente vai sendo formando junto aos grânulos de polifosfato e este material parece ter seu conteúdo aumentado ao longo do tempo. Com isto, há uma diminuição do material elétron denso e este tende a se localizar na periferia ou em uma das bordas, fornecendo a morfologia semelhante à meia lua visualizada nas células inteiras, e indicando um consumo ou redução do polifosfato e um aumento do material elétron lucente.

Em imagens de cortes também foi possível observar que os grânulos de polifosfato parecem estar em contato direto uns com os outros, ou se aproximando, o que indica a existência de interação entre eles. Além disto, também se observa um padrão de alinhamento, proximidade ou organização nos grânulos de polifosfato, o que também sugere uma associação com componentes do citoesqueleto como já sugerido para os acidocalcissomos de tripanosomatídeos (Docampo *et al.*, 2000).

Dez dias após a adição de fosfato ao meio, os grânulos elétron densos puderam ser verificados com maior intensidade nas células de Ankistrodesmus. Entretanto, as células já apresentavam grandes quantidades de lipídeos, portanto, muitos destes grânulos tiveram a sua morfologia afetada pela presença dos lipídeos. Esta morfologia do grânulo complementa a morfologia das gotas lipídicas. Isto sugere que o material que está sendo acumulado junto aos grânulos de polifosfato sejam de natureza lipídica. Outro indicativo é que o uso da citoquímica de lipídeos (Angermüller e Fahimi, 1982), permitiu a maior contrastação deste material que estava junto ao grânulo de polifosfato, reforçando esta ideia. Um terceiro ponto que sugere que o material acumulado no interior dos grânulos de polifosfato seja de natureza lipídica é o padrão morfológico observado na região central de um grânulo, onde este material elétron lucente apresentou um padrão de linhas semelhantes à uma impressão digital. Este padrão de linhas claras e escuras alternadas foi observado anteriormente em estrutura tridimensional no interior dos corpos lipídicos na microalga Schyzochytrium com acúmulo de ácidos graxos insaturados (Ashford et al., 2000). Vale ressaltar que os ácidos graxos insaturados também foram observados na microalga Ankistrodesmus, onde a adição de fosfato favoreceu o acúmulo de ácidos graxos insaturados.

Em trabalho publicado com *Phytomonas françai* (Miranda *et al.*, 2004) descreveu que os grânulos de polifosfato apresentaram padrões concêntricos em seu interior quando observados em cortes finos por microscopia eletrônica de transmissão, indicando uma primeira descrição para este padrão no interior dos grânulos. Além disto, os autores descrevem estruturas tubulares, que lembravam retículos endoplasmáticos

aumentados, contendo um material um elétron denso em seu interior, sugerindo que os grânulos de polifosfato poderiam estar envoltos por retículo endoplasmático. Estes padrões concêntricos observados nos grânulos de *Phytomonas françai* indicam uma possível semelhança entre os padrões concêntricos observados em *Ankistrodesmus*, bem como a presença de que parece ser uma membrana em expansão próximas aos grânulos de polifosfato na microalga. Desta forma, compreender o metabolismo relacionado aos grânulos de polifosfato na microalga *Ankistrodesmus* e a sua associação com os corpos lipídicos podem revelar informações relativas ao metabolismo de acúmulo de lipídeos de interesse para a produção de biocombustíveis.

6. CONCLUSÕES

Filamentos observados nos pólos das células das microalgas *Scenedesmus* apresentam estruturas não descritas na literatura e cuja localização seria passível de classificação como gênero *Desmodesmus*, indicando que apenas a classificação morfológica poderia causar mais confusão que esclarecimentos. A natureza destes filamentos deve ser estudada e a identificação da espécie deve utilizar as ferramentas de Biologia Molecular.

O fosfato acumulado intracelularmente é capaz de suportar o crescimento da microalga *Ankistrodesmus* e a ausência deste no meio de cultivo não interferiu na concentração do pigmento fotossintético clorofila, porém afetou a atividade fotossintética. Além disto, a sua ausência no meio induziu um acúmulo de lipídeos, favorecendo a formação ou a interconversão de ácidos graxos para outros com um menor número de insaturações.

As alterações na morfologia dos grânulos de polifosfato dependem da condição nutricional do meio, ou seja, da disponibilidade de fosfato extracelular, e da etapa de crescimento em que as células se encontram. Em condições de presença de fosfato. *Ankistrodesmus* apresentou um número de grânulos de polifosfato acima do observado para outros organismos e estes demonstraram ter uma localização preferencial na célula e um alinhamento, que podem indicar a presença de um citoesqueleto. Os grânulos de polifosfato parecem estar em contato, indicando uma possível interação entre eles.

A privação de fosfato do meio na microalga *Ankistrodesmus* induziu a uma rápida captação deste do meio, restabelecendo os estoques de polifosfato intracelulares e reforçando a observação da localização destes grânulos junto aos corpos lipídicos, indicando que parece existir uma relação direta entre os corpos de polifosfato e o local de acúmulo dos corpos lipídicos. Além disto, o lúmen do grânulo de polifosfato apresentou material elétron lucente, que revelou organização lamelar, semelhante ao padrão de lipídeos ou padrão de *fingerprint* observado em corpos lipídicos de microalga *Schyzochytrium*, indicando que a possível presença lipídica no interior destes grânulos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angermüller, S., Fahimi, H. D., 1982. Imidazole-buffered osmium-tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. The *Histochemichal Journal.*, 14:823–835.

Achbergerová, L., Nahálka, J., 2011. Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microbial Cell Factories*, 10:63.

An, S.S.; Friedl, T., Hegewald, E., 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedemus*-like coccoid green algae as infered from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant Biology* 1: 418–428.

APHA, 1995. Standard Methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation. 19a, Washington: Ed. Byrd. Repress Springfield. 1.134 p.

Benning, C., Huang, Z.H., Gage, D.A., 1995. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of Rhodobacter sphaeroides grown under phosphate limitation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317:103–111.

Besteiro, S., Tonn, D., Tetley, L., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2008. The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania. Journal of Cell Science*, 121:561–570.

Bicudo, C.E. de M, Menezes, M., 2006. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições. Editora Rima, São Carlos, SP, Brasil. Segunda Edição, 502 p.

Biolo, S., Siqueira, N.S., Bueno, N.C., 2009. Chlorococcales (Chlorophyceae) de um tributário do Reservatório de Itaipu, Paraná, Brasil. *Hoehnea* 36(4): 667-678.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37:911–917.

Bohnenberger, J.E. e Crosseti, L.O., 2014. Influence of temperature and nutrient content on lipid production in freshwater microalgae cultures. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 86(3):1239–1248, Rio de Janeiro.

Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., 1988. Microalgal biotechnology. *Cambridge: Cambridge University*, 477p.

Bortolini, J.C., Meurer, T., Godinho, L.R., Bueno, N.C., 2010. Chlorococcales planctônicas do Rio São João, Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil. *Hoehnea* 37(2):315–330.

Boyce, K.J., Kretschmer, M., Kronstad, J.W., 2006. The vtc4 gene influences polyphosphate storage, morphogenesis, and virulence in the maize pathogen Ustilago maydis. *Eukaryotic Cell* 5:1399–1409.

Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14:557–577.

Brown, M.R.W., Kornberg, A., 2008. The long and short of it – polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends in Biochemical Science*, 33(6):284–290.

Bruton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M., Rasmussen, M.B., 2009. A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland; Technical Report; Sustainable Energy Ireland:Dublin, Ireland.

Chisti, Y., 2004. Microalgae: our marine forests. Book reviews. Richmond, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. *Oxford: Blackwell Science*, 566p.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgal. *Biotechnology Advances*, 25:294–306.

Cho, S.H., Thompson, G.A.Jr., 1986. Properties of a fatty acyl hydrolase preferentially attacking monogalactosyldiacylglycerol in *Dunaliella salina* chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 878:353–359.

Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D., Bigogno, C. 2000. The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. *Biochemical Society Transactions* 28(6):740–743.

Christie, W.W., 2003. Lipid analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. "*Gas Chromatography and Lipids*" Bridgwater, UK: Oily Press.

Danielewicz, M.A., Anderson, L.A., Franz, A.K., 2011. Triacylglycerol profiling of marine microalgae by mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 52:2101–2108.

De Souza,W., 2007. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 357 p.

De Souza,W., 2010. Microscopia Óptica: fundamentos e aplicações às Ciências Biomédicas. 1 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 220 p.

Docampo, R., Moreno, S.N.J., 1999. Acidocalcisome: a novel Ca2+ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitology Today* 15, 443–448.

Docampo, R., Moreno, S.N.J., 2001. The acidocalcisome (Review). *Molecular & Biochemical Parasitology*, 33:151–159.

Docampo, R., Moreno, S.N.J., 2011. Acidocalcisomes (review). *Cell Calcium*, 50:113–119.

Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S.N., 2005. Acidocalcisomes conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3:251–261.

Dowhan. W., 1997. Molecular basis for membrane phospolipid diversity: Why are there so many lipids? *Annual Review of Biochemistry*, 66:199–232.

Droop, M.R., 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology*, 9, 264–272.

Ekman, A., Bülow, L., Stymne, S., 2007. Elevated atmospheric CO₂ concentration and diurnal cycle induce changes in lipid composition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 174, 591–599.

Emsley, J., 1980. The phosphorus cycle. In The Handbook of Environmental Chemistry, vol.1A, ed. O. Hutzinger, pp. 147–167. Berlin: Springer-Verlag.

Fan, J., Andre, C. and Xu, C., 2011. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 585, 1985–1991.

Ferreira, V. S., Pinto, R. F., Sant'Anna, C., 2015. Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Applied Microbiology*, 120 (3):661–670.

Flinn, K.J., Raven, J.A., Rees, T.A.V., Finkel, Z., Quigg, A., Beardall, J., 2010. Is the growth rate hyphothesis applicable to microalgae? (Review). *Journal of Phycology*, 46:1–12.

Fogg, G.E., 1973. Phosphorus in primary aquatic plants. *Water Research Pergamon Press*, 7:77–91.

Geiger, O., Rohrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T.M., Thomas-Oates, J.E., 1999. The regulator gene phoB mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N- trimethylhomoserine in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) meliloti. Molecular Microbiology, 32:63–73.

Gorham, P.R., Mclachlan, J., Harmer, U.T., Kim, W.H., 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.). *Verh. Internat. Verein Limnol.*, 15:769–780.

Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J., 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, 7:703–726.

Guccione, A., Biondi, N., Sampietro, G., Rodolfi, L., Bassi, N., Tredici, M.R., 2014. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. *Biotechnology for biofuels* 7:84.

Guiry M.D. em Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2013. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org; searched on 01 April 2013.

Guiry, M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org; searched on 16 March 2017.

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:1037–1047.

Harwood, J.L., Guschina, I.A., 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochemie*, 91:679-684.

Hashemi, F., Leppard, G.G., Kushner D.J.,1994. Copper resistance in *Anabaena variabilis*: effects of phosphate nutrition and polyphosphate bodies. *Microbial Ecology*, 27(2):159–176.

Hegewald, E., 1997. Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*, *Algae*, 12:235–246. Hegewald E., 2000. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). *Algological Studies*, 96,1–18.

Hegewald, E., Bock, C., Krienitz, L., 2013. A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Fottea*, 13(2): 149–164.

Hegewald, E., Silva, P., 1988. Annotated catalogue of *Scenedesmus* and nomenclaturally related genera including original descriptions and figures. *Bibliotheca Phycologica*, 80:1–587.

Hegewald, E., Wolf, M., 2003. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS–2 sequence comparisons. *Plant Systematics and Evolution*, 241:185–191.

Hentschke, G.S., Torgan L.C. 2010. Chlorococcales lato sensu (Chlorophyceae, excl. *Desmodesmus* e *Scenedesmus*) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia*, 65: 87–100.

Hu, Q., 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products - major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: Richmond, A., 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. *Oxford: Blackwell Science*, 264–272p.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. The *Plant Journal*, 54(4):621–639.

Hu,D.W., Liu,H., Yang, C.L., Hu, E.Z., 2008a. The design and optimization for lightalgae bioreactor controller based on Artificial Neural Network-Model Predictive Control. *Acta Astronautica*, 63(7):1067–1075.

Hutchinson, G.E., 1973. Eutrophication. American Scientist, 61:269–279.

Jayanta, T, Chandra, K.M., Chandra, G.B., 2012. Growth, Total Lipid content and Fatty Acid Profile of a Native Strain of the Freshwater Oleaginous Microalgae *Ankistrodesmus falcatus* (Ralf) grown under Salt Stress Condition. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8), 27–35.

Jensen, T.E., 1969. Fine structure of developing polyphosphate bodies in a blue-green alga, *Plectonema boryanum. Archiv für Mikrobiologie*, 67(4):328–338.

Jensen, T.E., Sicko-Goad, L.M., 1976. Aspects of phosphate utilization by blue green algae. United States Environmental Protection Agency. Office of Research and Development, Herbert H. Lehman College. 122 págs.

Kessler E., Schäfer M., Hümmer C., Kloboucek A., Huss V.A.R. 1997. Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Plant Biology*, 110(3):244–250.

Khan, S.A., Rashmi, Hussain, M.Z., Prasad, S., Banerjee, U.C., 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9):2361–2372.

Kornberg, A., 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*, 177(3):491–496.

Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Riché, D., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule with many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68:89–125.

Kornberg, A., 2008. Abundant microbial inorganic polyphosphate, poly P kinase are underappreciated. *Microbe*, 3:119.

Kulaev, I., Kulakovskaya, T., 2000. Polyphosphate and phosphate pump. *Annual Reviews of Microbiology*, 54:709–734.

Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovskaya, T.V., 2005. The functions of polyphosphates and polyphosphate- dependent enzymes. In: The biochemistry of inorganic polyphosphates, 2nd edn. Wiley, New York, pp 91–123.

Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovaskaya., T.V., 2004. The biochemistry of inorganic polyphosphates. Second edition. Jonh Wiley & Sons Ltd.

Kurat, C.F., Natter, K., Petschnigg, J., Wolinski, H., Scheuringer, K., Scholz, H., Zimmermann, R., Leber, R., Zechner, R., Kohlwein, S.D., 2006. Obese Yeast: Triglyceride Lipolysis Is Functionally Conserved from Mammals to Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(1):491–500.

Lander, N., Cordeiro, C., Huang, G., Docampo, R., 2016. Inorganic Polyphosphate (polyP) Physiology (Polyphosphate and acidocalcisomes). *Biochemical Society Transactions*, 44(1):7–12.

Lehman, J.T., 1976. Photosynthetic capacity and luxury uptake of carbon during phosphate limitation in Pediastrum duplex (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 12(2):190–193.

Levitan, O., Dinamarca, J., Hochman, G., Falkowski, P.G., 2014. Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends in Biotechnology*, 32, 117–124.

Li, X., Hu, H.Y., Gan, K., Sun, Y.X., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.*. *Bioresour*. *Technol*. 101:5494–5500.

Lee, R.E. 1980. Phycology. New York: Cambridge University Press.

Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 12:343–346.

Mandal, S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2): 281–291.

Merad, T., Archibald, A.R., Hancock, I.C., Harwood, C.R., Hobot, J.A., 1989. Cell wall assembly in *Bacillus subtillis*: Visualization of old and new wall material by electron microscopic examination of samples stained selectively for techoic acid and techuronic acid. *Journal of General Microbiology*, 135:645–655.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms (review). *Renewable Energy*, 34:1–5.

Meyer, A., 1904. Meyer A: Orientierende Untersuchungen ueber Verbreitung, Morphologie, und Chemie des Volutins. *Bot Zeit*, 1904, 62:113–152.

Minnikin, D.E., Abdolrahimzadeh, H., 1974. The replacement of phosphatidylethanolamine and acid phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorous-free lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Letters*, 43:257–260.

Minnikin, D.E., Abdolrahimzadeh, H., Baddiley, J., 1972. Variation of polar lipid composition of *Bacillus subtilis* Marburg with different growth conditions. *FEBS Letters*, 27:16–18.

Minnikin, D.E., Abdolrahimzadeh, H., Baddiley, J., 1974. Replacement of acidic phospholipids by acid glycolipids in *Pseudomonas diminuta*. *Nature*, 249:268–269.

Miranda, C.T., 2011. Avaliação dos efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de lipídeos por *Ankistrodesmus* sp. (*Chlorophyceae*) visando à produção de biodiesel. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós graduação em Biotecnologia Vegetal, Brasil, Rio de Janeiro. 73p.

Miranda, K., Benchimol, M., Docampo, R., Souza, W. de, 2000. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 86: 373–384.

Miranda, K., de Souza, W., Plattner, H., Hentschel., J., Kawazoe, U., Fanq. J., Moreno, S.N.J., 2008. Acidocalcisomes in apicomplexan parasites. *Experimental Parasitology*, 118(1):2–9.

Miranda, K., de Souza, W., Plattner, H., Hentschel, J., Kawazoe, U., Fang, F., Moresco, C., Bueno, N.C., 2007. Scenedesmaceae (Chlorophyceae – Chlorococcales) de um lago artificial urbano: *Desmodesmus* e *Scenedesmus*. *Acta Scientiarum*, *Biological Sciences*, 29:289–296.

Miranda, K., Docampo, R., Grillo, O., de Souza, W., 2004. Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. *Protist*, 155:395–405.

Murphy, D.J., Vance, J., 1999. Mechanisms of lipid body formation. *Trends in Biochemical Sciences*, 24:109–115.

Nagasaka, S., Yoshimura, E., 2008. External iron regulates polyphosphate content in the acidophilic, thermophilic alga *Cyanidium caldarium*. *Biological Trace Element Research*, 125:286–289.

Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., Pratt, S., 2009. Towards a luxury uptake process via microalgae – defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*, 43:4207–4213.

Persson, B.L., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., Lundh, F. 2003. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae. Current Genetics*, 43:225–244.

Ramos, I.B., Miranda, K., Pace, D., Verbist, K., Lin, F., Zhang, Y., Oldfield, E., Machado, E., De Souza, W., Docampo, R., 2010. Calcium and polyphosphatecontaining acidic granules of sea urchin eggs are similar to acidocalcisomes, but are not the targets for NAADP. *Biochemical Journal*, 429:485–495.

Rao, N.N., Kornberg, A., 1996. Inorganic polyphosphates support resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178:1394–1400.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 2001. Biologia Vegetal. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906p.

Raven J.A., 2013. RNA function and phosphorus use by photosynthetic organisms. *Frontiers in Plant Science*, 4:1–13.

Reusch, R.N., 1992. Biological complexes of poly- β -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiology Reviews*, 103:119–130.

Reusch, R.N., 2000. Transmembrane ion transport by polyphosphate/poly-(*R*)-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochemistry* (*Moscow*), 65:280–296.

Reynolds, C.S., 2006. Ecology of Phytoplankton. Ecology, Biodiversity and Conservation. Cambridge.

Riekhof, W.R., Sears, B.B., Benning, C., 2005. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the betaine lipid synthase BTA1_{Cr.} *Eukaryotic Cell February*, 4(2):242–252.

Robenek MJ, Severs NJ, Schlattmann K, Plenz G, Zimmer KP, Troyer D, Robenek H. 2004. Lipids partition caveolin-1 from er membranes into lipid droplets: Updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB Journal*, 18:866–868.

Rocha, G.S., Lombardi, A.T., Melão, M.da G.G., 2016. Influence of phosphorus on copper toxicity to *Selenastrum gracile* (Reinsch) Korshikov. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 128:30–35.

Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102:100–112.

Roessler, P.G., 1988. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(2):521–528.

Round, F.E., 1965. The biology of the algae. London: Edward Arnold (Publishers) Ltd, 269 p.

Ruiz, F.A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, Docampo, R., 2001. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, 49(7):46196–46203.

Santos, L.B. dos, 2011. Efeitos da variação da concentração de fósforo no crescimento e síntese lipídica por *Ankistrodesmus sp.* Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas: Biofísica – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, RJ, Brasil. 73 p.

Scott, D.A., Docampo, R., 2000. Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 275:24215–24221.

Seufferheld, M.J., Curzi, M.J., 2010. Recent Discoveries on the Roles of Polyphosphates in Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28:549–559.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. A look back at the US Department of Energy's aquatic species program - biodiesel from algae. Report NREL/ TP-580-24190, *National Renewable Energy Laboratory*, Golden, CO.

Shifrin, N.S., Chisholm, S.W., 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology*, 17(4):374–384.

Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y., Peltier, G., 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, 11:7.

Singh, A., Nigam, P.S., Murphy, J.D., 2011. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresource Technology*, 102:26–34.

Seufferheld, M.J., Curzi, M.J., 2010. Recent discoveries on the roles of polyphosphates in plants. *Plant molecular Biology Reporter*, 28:549–559.

Smillie, R.M. e Krotokov, G., 1960. Phosphorus-containing compounds in *Euglena* gracilis grown under different conditions. Archives of Biochemistry and Biophysics, 89:83–89.

Sommer, U., 1984. The paradox of the plankton: fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. *Limnology and Oceanography* 29: 633–636.

Sterner R.W., Elser J.J., 2002. Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.

Sukenik, A., Carmeli, Y., 1990. Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *Journal of Phycology*, 26:463–469.

Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., Fujimoto, T., 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. Journal of Biological Chemistry, 277(46):44507–44512.

Thiele, Trainor, F.R., 1998. Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae): phenotypic plasticity. Nova Hedwigia Beih., 117:1–367.

Trainor, F.R., Egan, P.F., 1990. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus* (Chlorophyta) with special reference to *S. armatus* unicells. *Phycologia*, 29:461-469.

Thiam, A.R., Forêt, L., 2016. Review The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861:715–722.

Valdez-Ojeda, R., González-Muñoz, M., Us-Vázquez, R., Narváez-Zapata, J., Chavarria-Hernandez, J.C., López-Adrián, S., Barahona-Pérez, F., Toledano-Thompson, T., Garduño-Solórzano, G., Medrano, R.M.E.G., 2015. Characterization of five fresh water microalgae with potential for biodiesel production. *Algal Research*, 7:33–44.

Van Bogelen, R.A., Olson, E.R., Wanner, B.L., Neidhardt, F.C., 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178:4344–4366.

Van Vuuren, S.J., Taylor, J., Van Ginkel, C., Gerber, A., 2006. Easy identification of the most common freshwater algae. A guide for the identification of microscopic algae in South African freshwaters. 211 páginas. ISBN 0-621-35471-6.

Vercesi, A.E., Moreno, S.N., Docampo, R., 1994. Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*, 304:227–233.

Woźniak, E.W., Shubert E., 2008. Systematics of *Desmodesmus* and *Scenedesmus*: a conundrum? In: Proceedings of the 56th meeting of British Phycological Society, January, Bristol, United Kingdom.

Yamagata, Y., Watanabe, H., Saitoh, M., Namba, T., 1991. Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. *Nature*, 352:516–519.

Yee, W., 2016. Microalgae from the Selenastraceae as emerging candidates for biodiesel production: a mini review. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 32(64):1–11. **Wu, Y.H., Yu, Y., Hu, H.Y., 2015.** Microalgal growth with intracellular phosphorus for achieving high biomass growth rate and high lipid/triacylglycerol content simultaneously. *Bioresource Technology*, 192:374–381.