



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REY

CURSO ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

TRANSFERÊNCIA DIRETA DE DNA PLASMIDIAL NAS CÉLULAS DE *Emiliana*
huxleyi POR MEIO DA BIOBALÍSTICA

Nathália Vercelli de Assis

Orientadora: Katialaine Corrêa de Araújo

Co-orientadora: Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco

Junho/2017

TRANSFERÊNCIA DIRETA DE DNA PLASMIDIAL NAS CÉLULAS DE *Emiliana*
huxleyi POR MEIO DA BIOBALÍSTICA

Nathália Vercelli de Assis

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às
exigências do Curso de Bacharelado em
Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del Rei.

Orientadora: Katialaine Corrêa de Araújo

Co-orientadora: Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco

Junho/2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REY

CURSO ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

TRANSFERÊNCIA DIRETA DE DNA PLASMIDIAL NAS CÉLULAS DE *Emiliana*
huxleyi POR MEIO DA BIOBALÍSTICA

Nathália Vercelli de Assis

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Katialaine Corrêa de Araújo- orientadora

Isabel Cristina Braga Rodrigues – co-orientadora

Igor José Boggione Santos- examinador 1

Mariana Dias Moreira- examinador 2

Ouro Branco, 23/06/2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me proporcionado tantas oportunidades maravilhosas nessa vida que me trouxeram até aqui, sem a permissão dele nada disso teria acontecido.

Em seguida sou grata eternamente por toda minha família, pais, irmã, tios e primos que são minha base de tudo, que sempre acreditaram em mim. Em especial minha eterna gratidão a minha mãe Nonata, uma mulher guerreira e minha heroína que sempre me deu apoio, que nunca mediu esforços para me ver feliz e incentivar meus estudos e principalmente nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Muito obrigada a minha irmã May por acreditar no meu esforço e dedicação. Agradeço por todo apoio do meu pai Anelito. Agradeço também a minha tia Rosângela, que também ajudou construir minha carreira acadêmica e ao meu tio Cláudio que é mais do que um tio: um segundo pai pra mim.

Agradeço imensamente aos meus amigos do GEFA pelo apoio e por trazerem luz e alegria aos meus dias. Ao meu grande irmão, amigo e pai de coração Weber, que sempre me deu todo o apoio durante essas batalhas finais, minha gratidão eterna. Agradeço imensamente aos meus amigos Fernanda, Tetê, Pedro Bruno e Elielbert que me ensinaram tanto, me deram forças e apoio para continuar seguindo em frente diante das tribulações da vida. E é claro a todos os outros amigos que indiretamente me deram palavras amigas e momentos de descontração que fizeram diferença nos meus dias.

Quero agradecer a UFSJ pela oportunidade de ingresso e entre tantas outras oportunidades fornecidas durante meu percurso. Agradeço em especial a todos os membros do Campus Alto Paraopeba que compõem esse ambiente especial que me acolheu por todos esses anos. Agradeço a Capes e ao CNPq pela oportunidade de participar do programa Ciências sem Fronteiras, onde não só pude fazer essa pesquisa e me engrandecer profissionalmente, mas também pessoalmente. Gratidão eterna a minha orientadora durante essa pesquisa na Universidade da Califórnia San Marcos (CSUSM), Dra. Betsy Read, uma profissional maravilhosa que admiro muito, que abriu seu coração para essa jovem que buscava oportunidades de aprendizado e conhecimento.

Agradeço imensamente a minha orientadora Katialaine e a minha co-orientadora Isabel pelas orientações, dedicação e apoio na elaboração desse trabalho e no meu percurso acadêmico. Aprendi muito com vocês!

Enfim agradeço a todos os envolvidos direta ou indiretamente nessa minha jornada!

RESUMO

Emiliana huxleyi é uma microalga unicelular ou cocolitoforídeo com grande importância na captação do gás carbônico e potencial para aplicação industrial nas áreas de ortodontia, nanotecnologia, alimentação, farmacêutica e bioenergia. Novas possíveis aplicações industriais podem ser descobertas determinando-se padrões para transformação da *Emiliana huxleyi*. Dentre os possíveis métodos de transformação a técnica de biobalística destaca-se por sua capacidade de transformar qualquer tipo de célula, independente da rigidez ou espessura, tendo sido usada com sucesso inclusive em diversos tipos de algas. A técnica consiste em acelerar micropartículas carregadas com DNA exógeno em direção a célula alvo por meio de alta pressão. Diversos fatores operacionais influenciam na eficiência da biobalística. Portanto, esse trabalho teve como objetivo determinar condições ótimas de bombardeamento de micropartículas para a cepa não calcificada da microalga *Emiliana huxleyi* CCMP 1516. Foram estabelecidos 10 padrões experimentais variando-se os parâmetros de distância entre a pressão inserida e as micropartículas bombardeadas (1/8, 1/4 e 3/8 polegadas), a distância do alvo (3, 6, 9 e 12 centímetros), discos de ruptura que resistem as pressões de 900, 1350 e 1550 psi e amostras controles que não foram bombardeadas. Foram utilizados *beads* fluorescentes magnéticos para determinar a melhor condição de bombardeamento e após as análises dos resultados, foi feito um bombardeamento com microportadores de ouro carregados com DNA plasmidial sintético chamado PAYCO com gene de resistência a piromicina. Avaliou-se a inserção dos *beads* por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. A microscopia de fluorescência mostrou a inserção dos *beads* dentro da célula da microalga *Emiliana huxleyi* e a sobrevivência da mesma após os processos de estresse. Embora não tenha sido possível definir um padrão ótimo de bombardeamento para a *Emiliana huxleyi* como proposto, comprovou-se que o método de biobalística é um método efetivo para inserção de DNA exógeno dentro da cepa CCMP 1516 da microalga *Emiliana huxleyi*.

PALAVRAS-CHAVE: Microalga. Bombardeamento. Transformação.

ABSTRACT

Emiliana huxleyi is a unicellular microalgae or coccolitoforid that has great importance in the capture of carbon dioxide and potential for industrial application in the areas of orthodontics, nanotechnology, food, pharmaceutical and bioenergy. New possible industrial applications can be discovered by determining standards *Emiliana huxleyi* transformation. Among the possible methods of transformation, the technique of biolistics stands out for its ability to transform any type of cell, regardless of stiffness or thickness, and has been successfully used even in various types of algae. The technique consists in accelerating microparticles loaded with exogenous DNA towards the target cell by means of high pressure. Several operational factors influence the efficiency of biobalistics. Thus, this study aimed to determine optimal microparticle bombardment conditions for the non-calcified strain of *Emiliana huxleyi* CCMP 1516 .Ten experimental standards were established by varying the distance parameters between the inserted pressure and the bombarded microparticles (1 / 8, 1 / 4 and 3/8 inches), the target distance (3, 6, 9 and 12 centimeters), the rupture disks that resist pressures of 900,1350 and 1550 psi and control samples that were not bombarded. Magnetic fluorescent beads were used to determine the best bombardment condition and after analysis of the results, a bombardment was performed with gold microcarriers loaded with synthetic plasmid called PAYCO with puromycin resistance gene. Fluorescence microscopy showed the insertion of the beads into the cell of the microalgae *E.hux*.microalgae and its survival after the stress processes. Although it was not possible to define an optimal bombardment standard for *Emiliana huxleyi* as proposed, it was proved that the biolistics method is an effective method for insertion of exogenous DNA into the CCMP 1516 strain of the microalgae *Emiliana huxleyi*.

KEY WORDS: Microalgae. Bombarment.Transformation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representantes de cada grupo de algas	15
FIGURA 2: Diferentes tipos da estrutura dos cocolitóforos da microalga <i>Emiliana huxleyi</i> .	17
FIGURA 3: Um <i>bloom</i> de <i>Emiliana huxleyi</i> no sul de Cornwall no Reino Unido	18
FIGURA 4: Microscopia eletrônica de uma água azul turquesa retirada do leste do Mar de Bering.	18
FIGURA 5: Esquema geral do princípio de eletroporação.	20
FIGURA 6: Diferentes tipos de ondas liberados durante o processo de eletroporação.	21
FIGURA 7: Equipamento de eletroporação	22
FIGURA 8: Estrutura de uma fibra de carbetto de silício	23
FIGURA 9: Esquema geral de uma máquina de bombardeamento de micropartículas	24
FIGURA 10: Esquema do processo de bombardeamento de micropartículas.	25
FIGURA 11: Citogramas geradas das amostras controle e das amostras bombardeadas	35
FIGURA 12: Citogramas geradas das amostras controle e das amostras bombardeadas	37
FIGURA 13: Citogramas geradas das amostras controle e das amostras bombardeadas	38
FIGURA 14: Micrografias de luz branca e fluorescente comprovando a inserção de um <i>bead</i> fluorescente magnético dentro de uma célula de <i>Emiliana huxleyi</i> .	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. OBJETIVO GERAL	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2.2.1. Obter e preparar do DNA exógeno a ser inserido	11
2.2.2. Efetuar o bombardeamento e separação magnética (quando usado <i>beads</i> magnéticos)	11
2.2.3. Avaliar o uso da técnica de bombardeamento para a inserção de DNA exógeno em <i>Emiliana huxleyi</i> e seu impacto na viabilidade celular por meio da citometria de fluxo e microscopia fluorescente	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1. Algas	12
3.2. <i>Emiliana huxleyi</i>	13
3.3. Métodos de transferência direta /inserção de DNA	19
3.3.1. Eletroporação	19
3.3.2. Fibras de carboneto de silício (<i>Silicon Carbide Whiskers</i>)	22
3.3.3. Biobalística	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Obtenção das células de <i>Emiliana huxleyi</i> para transformação	29
4.2. Obtenção e preparo do DNA exógeno a ser inserido	30
4.3. Bombardeamento e separação magnética (quando for usado <i>beads</i> magnéticos)	31
4.3.1 Bombardeamento e separação magnética (quando usado <i>beads</i> magnéticos)	31
4.3.2. Separação magnética (para as esferas magnéticas)	32
4.4. Avaliação o uso da técnica de bombardeamento para a inserção de DNA exógeno em <i>Emiliana huxleyi</i> e seu impacto na viabilidade celular por meio da citometria de fluxo e microscopia fluorescente.	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6 . CONCLUSÃO	40
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	40
8 . REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

Algas são plantas que não possuem raízes, caules ou folhas de estrutura unicelular ou multicelular. Todas contêm cloroplastos, organelas membranosas que lhes conferem a capacidade de realizar fotossíntese. Elas podem ser encontradas em águas marinhas e doces, em solos, na superfície de plantas e fazendo simbiose com fungos (líquens). Seus grupos são classificados de acordo com a quantidade de espécies, tipos de pigmentos fotossintetizantes, presença e quantidade de flagelos, reserva de carboidratos e estrutura da superfície celular e *habitat* natural (Parker et al, 1997 e Raven et al, 2014). Elas podem ser cultivadas em biorreatores, em tanques de grandes volumes ou em pequenas lagoas (Scragg, 2005; Yusoff et al, 2015; Chang et al, 2017) e têm grandes aplicações na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica, biocombustíveis, biorremediação entre outras. Portanto, é de grande importância o estudo do potencial, da aplicabilidade industrial das algas devido à substituição por compostos não renováveis e menos saudáveis, e principalmente pelo descobrimento de novas aplicações em prol da sociedade. (Scragg 2005; Rebours et al, 2012; Vaz et al 2015 e Rajendran e Hu, 2016).

Emiliana huxleyi tem um potencial diferenciado das outras algas já utilizadas industrialmente, pelos potenciais de produção de materiais para estruturas periodontais, armações ósseas, engenharia de tecidos, como implantes biodegradáveis ou ainda em nanotecnologias que produzem equipamentos ou materiais eletrônicos na área de telecomunicação (Read, Betsy). Essa microalga é do grupo das haptófitas, considerada um cocolitoforídeo por possuir na sua forma diploide cocolitos ou exoesqueletos, que são estruturas compostas de carbonato de cálcio que envolve a célula da microalga. Ela é conhecida por suas florações ou “*blooms*” de cor azul turquesa nos oceanos que podem ser vistos por imagens de satélite. *Emiliana huxleyi* também tem grande importância na captação do gás carbônico, participando em grande parte da fixação total de carbono em certas regiões (Baker, 2013; Read et al, 2013, Merico e Tyrell, 2004; Mireles, 2014), sintetiza lipídios que são usados como suplementos nutricionais, substituintes de petróleo e precursores de polímeros como outras algas em aplicações industriais (Read et al, 2013). O que torna essa alga um Segundo Mireles (2014) e Mystikou et al (2016), *Emiliana huxleyi* destaca entre os outros cocolitoforídeos por crescer mais do que qualquer outro cocolitoforídeo e facilidade de adaptação para cultivo em laboratório.

Seu genoma foi completamente sequenciado, em 2013, por Dr. Read e colaboradores que constataram que a *Emiliania huxleyi* possui aproximadamente trinta mil genes. A determinação de um sistema de transformação genética padrão para a microalga *Emiliania huxleyi* proporcionará estudos mais aprofundados sobre detalhes de suas vias metabólicas, expressão gênica (silenciamento ou superexpressão dos genes) e os processos biológicos das células. A compreensão dos mecanismos moleculares, identificando genes e proteínas que regulam a calcificação (biomineralização), ou seja, a formação de estruturas exógenas compostas de cálcio (cocólitos) do lado externo dessa microalga, proporcionará a tornar seus potenciais em aplicações industriais. Assim diversas aplicações dessa microalga na indústria de bioenergia, biorremediação de águas e solos, alimentação e outras poderão ser definidos (Read et al,2013; Mireles, 2014).

Um método direto de transformação para células de algas é o bombardeamento de micropartículas ou biobalística, que consistena transferência de microportadores de tungstênio ou ouro carregados com DNA em células por meio de pressão emitida por gás hélio gerando uma alta velocidade de emissão das micropartículas. O bombardeamento de micropartículas pode ser utilizado para transformar células de bactérias, fungos, insetos, plantas e animais. (Bio-Rad Laboratories;Yadava et al,2016;Doron et al,2016). Variando-se os parâmetros desse processo de acordo com organismo a ser transformado, pode-se conquistar um padrão ótimo de transformação (Bio-Rad Laboratories e Mireles, 2014).Dentre as técnicas de transformação disponíveis a biobalística se destaca pela capacidade de grande quantidade de micropartículas de ou tungstênio carregadas com DNA (microportadores) com alta energia cinética penetrarem todas as barreiras celulares independente da rigidez ou da espessura transformar assim qualquer tipo de célula(Hallmann, 2007 e Cejudo et al2008). Segundo Hallmann (2007) e Mireles (2014),vários tipos de algas foram transformadas por meio da técnica de biobalística:*Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Dunaliella salina*, *Gracilaria changii*, *Laminaria japonica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Navicula saprophila*, *Cyclotella cryptica*, *Euglena gracilis*, *Porphyridium sp.*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Haematococcus pluvialis*, '*Chlorella*' *kessleri*, e *Chlorella sorokiniana*.

Sendo assim, determinando-se parâmetros padrão para transformação da *Emiliania huxleyi* por meio do bombardeamento de micropartículas de forma eficiente e econômicaé possível a abertura de novos horizontes de possíveis aplicações industriais em áreas de bioenergia, biorremediação, alimentação e outras possíveis de serem descobertas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar condições ótimas de bombardeamento de micropartículas para a cepa não calcificada da microalga *Emiliana huxleyi* CCMP (atual NCMA) 1516 para a transferência direta de DNA plasmidial para dentro da célula almejando.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Obter células de *Emiliana huxleyi* para transformação;

2.2.2. Obter e preparar DNA exógeno a ser inserido;

2.2.3. Efetuar o bombardeamento e separação magnética (quando usado *beads* magnéticos); Avaliar o uso da técnica de bombardeamento para a inserção de DNA exógeno em *Emiliana huxleyi* e seu impacto na viabilidade celular por meio da citometria de fluxo e microscopia fluorescente.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Algas

Segundo Slonczewski e Foster, algas são plantas que não possuem raízes, caules ou folhas de estrutura unicelular ou multicelular. Todas contêm cloroplastos, organelas membranosas que lhes conferem a capacidade de realizar fotossíntese. Elas podem ser encontradas em águas marinhas e doces, em solos, na superfície de plantas e fazendo simbiose com fungos (líquens). As algas marinhas flutuantes captam mais dióxido de carbono que as plantas terrestres devido ao seu metabolismo versátil que não só realiza fotossíntese, mas também pode crescer utilizando compostos orgânicos (Scragg, 2005 e Yamagishi-Costa et al, 2017).

Alguns fatores são usados para caracterizar algas, tais como o *habitat* natural (água doce ou marinhas), o tipo de pigmento (clorofila a, b, c, ou ficobilinas, fucoxantinas ou carotenóides), o tipo de carboidratos usado como estoque (amido, paramido, crisolaminarina, óleo, laminarina ou manitol), a estrutura da parede celular (películas, camadas de placas ou vesículas, escamas, ou plasmodesmos) e o tipo de motilidade (presença ou não de flagelos) (Parker et al, 1997 e Raven et al, 2014). A presença de clorofila na maioria das algas é o que caracteriza a pigmentação verde presente nas mesmas. A tabela 1 apresenta os grupos de algas existentes: euglenófitas, criptófitas, haptófitas, dinoflagelados, diatomáceas, douradas, verdes- amarelas, pardas, vermelhas e verdes (Parker et al, 1997 e Raven et al, 2014). Essa tabela indica o número de espécies, os pigmentos fotossintetizantes, a reserva de carboidratos, a presença de flagelos, a superfície celular e o *habitat* de cada grupo. Na figura 1 é mostrado exemplos de representantes de cada grupo de algas.

Grupo	Número de espécies	Pigmentos fotossintetizantes	Reserva de carboidratos	Flagelos	Superfície celular	Habitat
Euglenoides (Euglenophyta)	800 a 1000	A maioria não tem ou tem clorofilas a e b; carotenoides.	Paramido.	Geralmente 2; frequentemente e desiguais, com 1 anterior e 1 posterior ou muito curto; estendem-se apicalmente.	Película com estrias proteicas, flexível ou rígida sob a membrana plasmática.	Principalmente água doce, alguns são marinhos.
Criptófitas (Cryptophyta)	200	Nenhum ou clorofilas a e c; ficobilinas; carotenoides.	Amido.	2; desiguais; subapicais; pilosos.	Camada rígida de placas proteicas sob a membrana plasmática.	Marinho e água doce; águas frias.
Haptófitas (Haptophyta)	300	Clorofilas a e c; carotenoides; especialmente fucoxantina.	Crisolaminarina.	Nenhum ou 2; iguais ou desiguais; a maioria tem haptonema	Escamas de celulose; escamas de material orgânico calcificado em algumas.	A grande maioria das espécies é marinha, algumas são de água doce.
Dinoflagelados	4000	Nenhum ou muitos ou clorofilas a e c; carotenoides, principalmente peridina	Amido.	Nenhum (exceto nos gametas) ou 2, desiguais; lateral (1 transversal, 1 longitudinal)	Camadas de vesículas sob a membrana plasmática, com ou sem placas de celulose.	Muitas espécies são marinhas, várias espécies são de água doce; algumas espécies mantêm relações simbióticas.
Diatomáceas* (Bacillariophyceae)	10000 a 12000 reconhecidas.	Nenhum ou clorofilas a e c; carotenoides; principalmente fucoxantina.	Crisolaminarina.	Nenhum ou 1; apenas nos gametas do tipo cêntrico, apical; piloso.	Sílica.	Marinho ou de água doce.
Algas douradas* (Chrysophyceae)	1000	Nenhum ou clorofilas a e c; carotenoides; principalmente fucoxantina.	Crisolaminarina.	Nenhum ou 2; apical; piloso anterior, liso posterior.	Escamas de sílica; celulose nas escamas de algumas.	Predominantemente de água doce; algumas marinhas.

Algas verdes-amarelas (Xanthophyceae)	600	Clorofilas a e c; carotenoides; mas sem fucoxantina.	Óleo.	Nenhum ou 2; piloso anterior, liso posterior.	Celulose, algumas vezes com sílica.	Predominantemente água doce ou solo, algumas marinhas.
Algas pardas* (Phaeophyceae)	1500	Clorofilas a e c; carotenoides; principalmente fucoxantina.	Laminarina; manitol (transportado).	2; apenas nas células reprodutoras; laterais; piloso anterior, liso posterior.	Celulose embebida na matriz de algina, mucilaginosas; plasmodesmos em algumas espécies.	Quase todas as espécies são marinhas; a maioria das regiões temperadas e polares, florescem em águas oceânicas geladas.
Algas vermelhas (Rhodophyta)	6000	Clorofila a; ficobilinas; carotenoides.	Amido das florídeas.	Nenhum.	Microfibrilas de celulose embebidas na matriz (geralmente galactanas); depósitos de carbonato de cálcio em muitas espécies.	Predominantemente marinho, cerca de 100 espécies são de água doce; muitas espécies tropicais.
Algas verdes	17000	Clorofilas a e b; carotenoides.	Amido.	Nenhum ou 2 (ou mais); apicais ou subapicais; iguais ou desiguais; lisos.	Glicoproteínas, celulose ou polissacarídeos não celulósicos; plasmodesmos em algumas espécies.	A maioria das espécies é aquática, água doce ou salgada; muitas espécies mantêm relações simbióticas.

Tabela 1: Grupos de algas existentes segundo Raven et al (2014) e Parker et al (1997): as euglenófitas, criptófitas, as haptófitas, dinoflagelados, diatomáceas, douradas, verdes-amarelas, pardas, vermelhas e verdes.

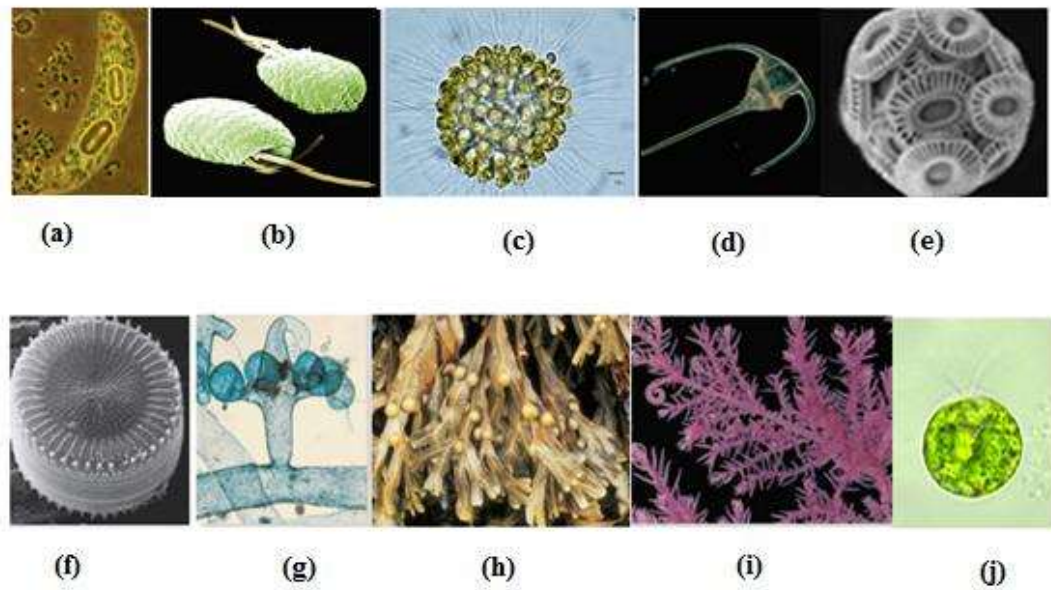


Figura 1: Representantes de cada grupo de algas existentes segundo Raven et al (2014). Em (a), tem-se uma célula de uma alga representante do grupo Euglenófitas, a *Euglena*, exibindo dois grandes grãos de paramido e sua superfície estriada; (b) *Cryptomonas*, uma criptófitas; (c) uma colônia da alga dourada *Chrysosphaerella longispina*, do grupo das crisófitas ;(d) *Ceratium tripos*, um dinoflagelado sem placas; (e) *Emiliana huxleyi*, representando o grupo das haptófitas (f) *Cyclotella meneghiniana*, uma diatomácea cêntrica; (g) *Vaucheria*, representando o grupo das algas verdes-amarelas; (h) *Fucus vesiculosus*, representante das algas pardas; (i) *Bonnemaisonia hamifera*, representante das algas vermelhas; (j) *Chlamydomonas sp.*, representante do grupo das algas verdes (adaptado de Raven et al, 2014 e Baker et al, 2013).

Alguns exemplos de aplicações de algas são: suplementos alimentícios oriundos das algas *Chlorella* e *Spirulina*; adição de ácidos graxos da alga *Cryptocodium cohnii* no leite; adição de compostos ativos da *Spirulina* spp em gelatinas, gomas de mascar, em cosméticos e outros produtos diários; suplementação com proteínas de algas verdes na alimentação de animais terrestres; alimentação direta de seres aquáticos por diátomos e crisófitas; produção de pigmentos para conferir coloração rosada para frutos do mar, produção de vitaminas por meio dos carotenóides de algas verdes e outras colorações de alimentos utilizando algas vermelhas; produção de ácidos graxos insaturados (ômega-3 e ômega-6) que são essenciais na dieta humana e animal, além do uso em tratamento de solos e águas; produção de biocombustíveis como hidrogênio, biodiesel e bioetanol, (Scregg 2005; Rebours et al, 2012; Vaz et al 2015 e Rajendran e Hu, 2016;).

As microalgas são algas unicelulares que crescem em água doce ou salgada (Scregg, 2005 e Vaz et al, 2015). Vaz et al (2015) acrescenta que os metabólitos produzidos por microalgas, especificamente, como ácidos graxos, vitaminas, proteínas e pigmentos possuem atividades antimicrobianas. Na maioria das microalgas esses compostos estão presentes na biomassa, mas também ocorrem de serem excretados no meio onde crescem (exometabólitos). As microalgas têm tido grandes aplicações na indústria de alimentos (Scregg, 2005; Smith et al, 2016; Vaz et al, 2015), cosmética (Bajguz et al, 2017), farmacêutica (Bajguz et al, 2017; Rebours et al, 2012; Vaz et al 2015), biocombustíveis (Scregg, 2005; Rasala et al, 2011; Tweed et al, 2012; Rebours et al, 2012; Sciandra et al, 2015 e Bajguz et al, 2017), biorremediação (Scregg, 2005; Rebours et al, 2012 e Rajendran e Hu, 2016;) e tratamento de águas residuária (Hallmann, 2007). Com isso se verifica a importância do estudo das mesmas para extração de produtos que possam ser aplicados industrialmente.

3.2. *Emiliana huxleyi*

Segundo Merico e Tyrell (2004), *Emiliana huxleyi* é uma microalga considerada um fitoplâncton de diâmetro variando de 5 a 10 micrômetros e volume de 158-270 micrometros cúbicos. Sendo uma das espécies de cocolitóforídeos, cujos cocolitóforos ou cocólitos são escamas ou exoesqueletos compostos de carbonato de cálcio (calcário) (Parker et al, 1997; Raven et al, 2014; Merico e Tyrell, 2004; Read et al, 2013;). Pertencendo ao grupo das Haptofitas é considerada a mais numerosa espécie de fitoplanctons (Raven et al, 2014; Merico e Tyrell, 2004). Devido aos diversas sobreposições do cocolitóforos, a *Emiliana huxleyi* possui diferentes tipos celulares como mostrado na Figura 2 (Read et al, 2013).

A microalga *Emiliana huxleyi* foi nomeada em homenagem a seus descobridores Cesare Emiliani (1922-1995) e Thomas Huxley, que extraíram os cocolitóforídeos de sedimentos do fundo do oceano e os examinaram (Baker, 2013; Black, 2013; Department of Geological, 2017; Merico e Tyrell, 2004). Seu genoma foi completamente sequenciado, em 2013, por Dr. Read e colaboradores que constataram que a possui aproximadamente trinta mil genes (Read et al, 2013).

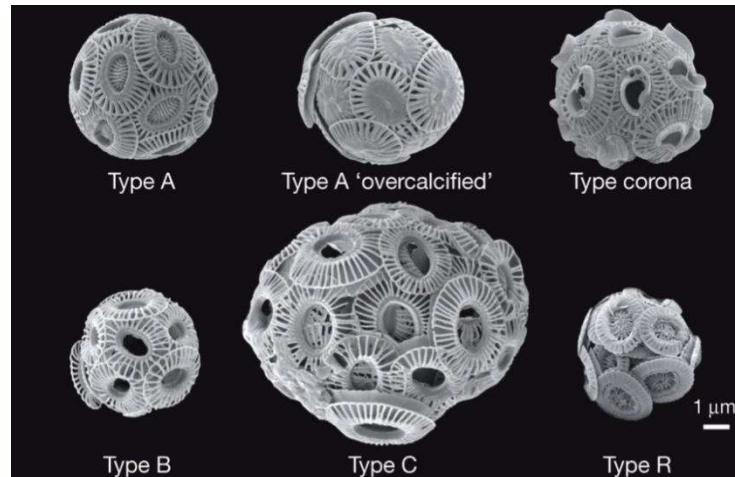


Figura 2: Diferentes tipos da estrutura dos cocolitóforos da microalga *Emiliania huxleyi*. A microalga *Emiliania huxleyi* possui cocólitos que parecem microconchas compostas de carbonato de cálcio que é considerada uma barreira para o processo de transformação por biobalística (Read et al, 2013).

Essa microalga possui grande importância na captação do gás carbônico, participando em grande parte da fixação total de carbono em certas regiões. Quando reunidas em grandes quantidades, abrangem milhares de quilômetros nos oceanos formando florações ou “*blooms*”. Esses “*blooms*” são responsáveis pela coloração azul turquesa nos oceanos e podem ser facilmente observados do espaço por imagens de satélite como mostrado na Figura 3 (Shiraiwa et al, 2015; Baker et al, 2013; Read, Betsy; Merico e Tyrell, 2004; Mireles, 2014). Porém segundo Merico e Tyrell (2004), nem sempre o aspecto claro ou azul turquesa dos oceanos é devido a presença das florações da *Emiliania huxleyi* nessas regiões. A Figura 4 exibe uma micrografia eletrônica de uma amostra de água azul turquesa retirada do leste do mar de Bering com sedimentos calcários oriundos das costas ou penhascos, de camadas de carbonato de cálcio já existente no mar, altas concentrações de enxofre no oceano ou simplesmente a somente os cocólitos da microalga (célula já morta) remanescentes de um ano anterior, que foram ressuspensos pela movimentação do mar durante tempestades. Logo para saber se da existência da *Emiliania huxleyi* em qualquer região do oceano, deve-se primeiramente retirar-se uma amostra e verificar de que se trata da microalga viva.



Figura 3: Um *bloom* de *Emiliana huxleyi* no sul de Cornwall no Reino Unido tirado em 24 de julho de 1999 por Steve Groom no laboratório marinho Plymouth (*Plymouth Marine Laboratories*). Sob certas condições esses “*blooms*” da *Emiliana huxleyi* podem ser detectados por satélites parecendo nuvens na água, o que na verdade é o reflexo da luz de bilhões de seus cocólitos flutuando na coluna de água (Groom, 1999).

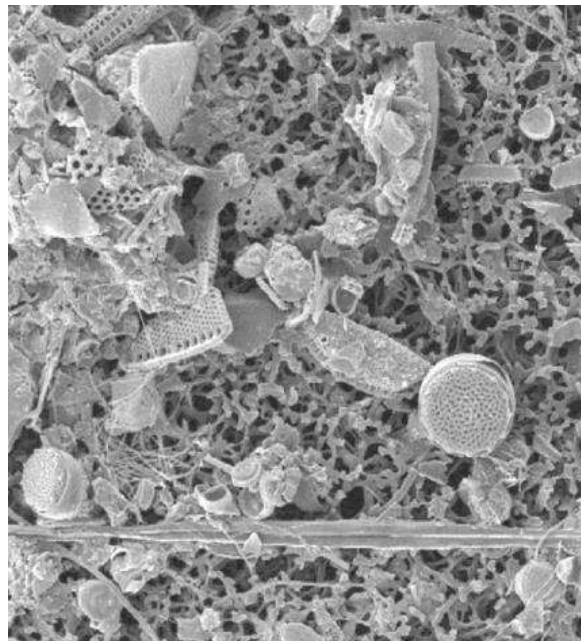


Figura 4: Microscopia eletrônica de uma água azul turquesa no leste do Mar de Bering. A imagem exemplifica que a cor vista não corresponde exatamente a microalga *Emiliana huxleyi*, mas sim de restos de paredes de sílica de diátomos, outro tipo de fitoplâncton (Merico e Tyrell, 2004).

Emiliana huxleyi tem um potencial diferenciado das outras algas já utilizadas industrialmente, pelos potenciais de produção de materiais para estruturas periodontais, armações ósseas, engenharia de tecidos, como implantes biodegradáveis ou ainda em

nanotecnologias que produzem equipamentos ou materiais eletrônicos na área de telecomunicação (Read, Betsy). *Emiliana huxleyi* também sintetiza lipídios que são usados como suplementos nutricionais, substituintes de petróleo e precursores de polímeros como outras algas em aplicações industriais (Read et al, 2013). Segundo Mireles (2014) e Mystikou et al (2016), a *Emiliana huxleyi* destaca entre os outros cocolitoforídeos por crescer mais do que qualquer outro cocolitoforídeo e facilidade de adaptação para cultivo em laboratório.

3.3. Métodos de transferência direta /inserção de DNA

Transformação genética é a captação de DNA livre do meio ambiente que leva a modificação genética de um organismo (Raven et al, 2014; Simmons e Snustad, 2009) de forma a lhe conferir características novas como aumento da produção de proteínas (Grosser et al, 2014; Yao et al, 2015), lipídios (Chattopadhyay et al, 2014), ganho de resistência a antibióticos (Andersson e Hugges, 2017), ganho de resistência a insetos e herbicidas (Saucy et al, 2017; Walker et al, 2015 e Scregg, 2005).

Alguns dos métodos utilizados para transformação genética são bombardeamento de micropartículas ou biobalística, eletroporação e fibras de carbono de silício.

3.3.1. Eletroporação

A eletroporação consiste em expor a célula alvo em um campo de alta intensidade elétrica que forma poros na membrana temporariamente ou permanentemente (Rubinsky et al, 2016; Bio-Rad Laboratories). Segundo Stasi; Borges e Iorio (2007), a formação dos poros se dá pelo fenômeno chamado iontoforese ou ionoforese. Nesse fenômeno, a ação de um gradiente elétrico constante ocasiona um aumento do momento dipolar das cabeças lipídicas hidrofílicas da membrana, fazendo estas repelirem-se entre si e temporariamente separam-se permitindo a transferência de massa de moléculas por difusão. Horne; Kera e Agerwala; (2009) acrescenta que a entrada de reagentes carregados como DNA plasmidial é facilitada devido a esse fenômeno, que facilita o movimento das moléculas de DNA carregadas negativamente em direção ao eletrodo de polo positivo. Dessa forma, como mostrado na figura 5, a membrana se desestabiliza, tornando-se permeável e consequentemente o DNA exógeno presente no meio move-se por difusão para dentro da célula. Quando o campo elétrico é desligado, os poros da membrana fecham e bloqueiam a saída do DNA exógeno de volta para o meio, garantindo assim a inserção do DNA na célula.

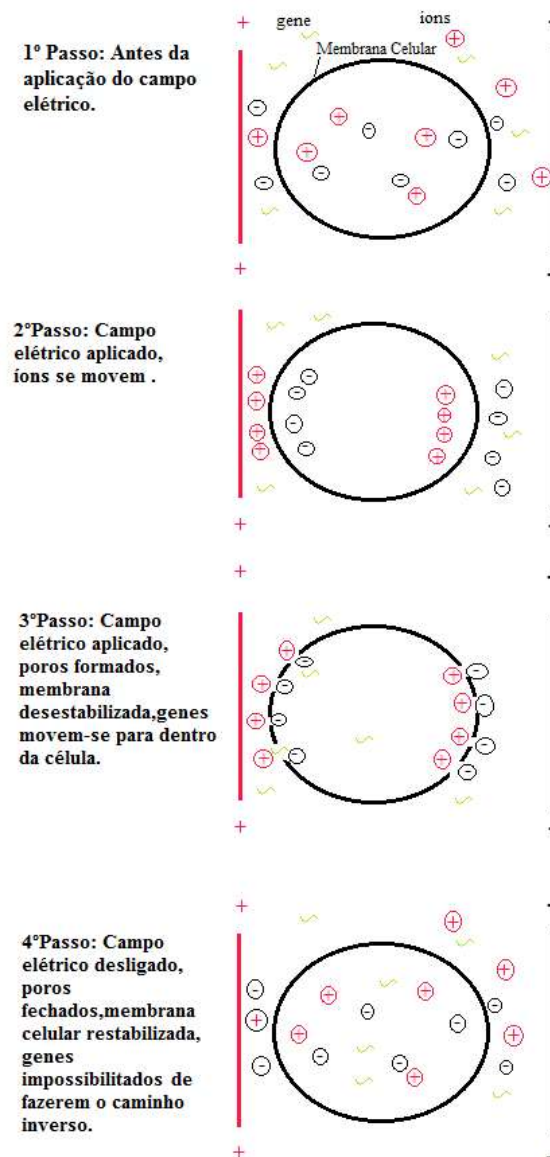


Figura 5: Esquema geral do princípio de eletroporação. Um campo elétrico de alta intensidade é aplicado em um meio contendo a célula alvo, o gene a ser inserido e íons de cargas opostas. Uma vez criado os poros o gene a ser inserido passa para dentro da célula. Quando o campo elétrico é desligado os poros da membrana se fecham de maneira que o gene exógeno permanece no interior da célula (adaptação da Bio-Rad Laboratories).

Existem dois tipos de pulsos elétricos que podem ser aplicados: com formas de onda exponenciais ou quadradas, como exibido na Figura 6. Nas formas de ondas exponenciais, os capacitores são carregados a uma voltagem pré-determinada. Essa voltagem fixa é liberada do capacitor selecionado e cai de forma exponencial de acordo com o tempo. Já na forma de onda quadrada, a voltagem é determinada pela duração do pulso e/ou pelo número de pulsos

dados. Uma sequência de pulsos variados pode ser mais vantajosa do que um pulso longo. As formas de ondas geradas durante a eletroporação estão relacionadas na eficiência do processo para diferentes tipos de células. Tanto o pulso de onda de queda exponencial quanto a de forma quadrada tem sido utilizadas de forma efetivas para eletroporação (Bio-Rad Laboratories).

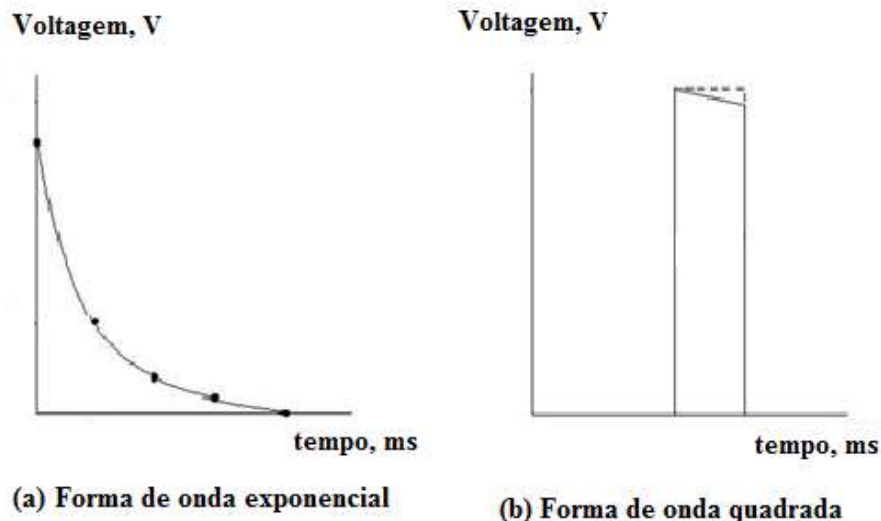


Figura 6:Diferentes tipos de ondas liberados durante o processo de eletroporação. Em (a), a forma de onda exponencial possui uma voltagem fixa pré-determinada que durante o processo de descarga ela vai sofrendo uma queda de forma exponencial. Já a forma de onda quadrada mostrada em (b) se dá quando pulsos de intensidade variadas são dados em sequência ou quando somente um pulso é dado por um tempo mais longo. Nesse caso, a cada pulso dado vai de uma voltagem inicial máxima e depois sofre uma queda brusca quando o pulso é finalizado (adaptado de Bio-Rad Laboratories).

A Figura 7 mostra o equipamento de eletroporação *Gene Pulser Xcell* da *Bio-Rad Laboratories* do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado da Califórnia (*CSUSM*). Esse equipamento possui o visor onde as configurações dos processos são determinadas, a câmara onde a cubeta com as células alvo e o gene exógeno são colocados, e o botão vermelho é o pulso.

A eletroporação é uma metodologia fácil de reproduzir e pode ser aplicada a uma grande variedade de células. Porém ocorre a morte de algumas ou todas as células. Essa desvantagem foi vista por Peter; Azencott e Prausnitz;(2007) ao observar a lise celular da alga *Chlamydomonas reinhardtii* submetida a eletroporação. Nesse caso a otimização do processo pode controlar essa desvantagem (Bio-Rad Laboratories; Peter; Azencott; Prausnitz;2007).



Figura 7: Equipamento de eletroporação *Gene Pulser Xcell* da *Bio-Rad Laboratories* do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado da Califórnia (*CSUSM*). O equipamento possui o visor onde as configurações dos processos são determinadas, a câmara onde a cubeta com as células alvo e o gene exógeno são colocados, e o botão vermelho é o pulsor (foto da autora).

3.3.2. Fibras de carboneto de silício (*Silicon Carbide Whiskers*)

É uma técnica recentemente desenvolvida para transferência direta de DNA que mistura fibras de carboneto de silício, o DNA contendo o gene de interesse a ser inserido e a suspensão de células a serem transformadas. Quando essa mistura é agitada as fibras com formato de agulha, como mostrado na Figura 8, penetra nas células furando-as resultando na transferência do DNA (Scregg, 2005).

A duração e a velocidade do processo de mistura é a parte mais crítica do processo, pois afetam significativamente a inserção do DNA na célula alvo. O uso do *vortex* tem sido mais utilizado para o processo de mistura. A oscilação rápida das células com a nanoestrutura das fibras de carboneto de silício pode resultar em uma efetiva entrega do DNA exógeno e uma quantidade suficiente de células sobrevivem para reproduzir outras células, o que condiciona uma transformação estável. Outro parâmetro que também pode ser variado é a concentração das fibras de carboneto de silício adicionada. Quando se utiliza alta velocidade e duração da agitação mais uma alta concentração das fibras adicionadas, o dano causado as células aumenta, ocasionando morte celular (Arshad e Asad, 2011).

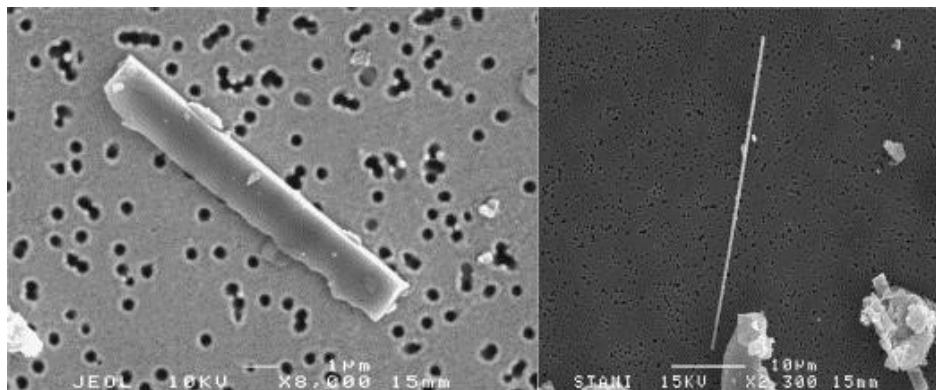


Figura 8: Estrutura da fibra de carboneto de silício na escala de 1µm (imagem da esquerda) e 10µm (imagem da direita). A estrutura da fibra de carboneto de silício se compara ao formato de uma agulha, que ao entrar em contato com a célula, penetra na membrana celular, promovendo a transferência de DNA para dentro da célula (Bakke et al,2008).

De acordo com TG Dunahay (1993), a transformação da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* foi realizada utilizando pela agitação de fibras de carboneto de silício e DNA plasmidial. Segundo Dunahay, esse método é considerado um método eficiente e pode ser utilizado para outras espécies de alga.

3.3.3. Biobalística

O processo de biobalística consiste na transferência de macromoléculas como DNA ou RNA para dentro de células por meio de alta pressão de gás que acelera essas partículas na direção das células (Scregg, 2005). O bombardeamento de micropartículas pode ser utilizado para transformar células de fungos (Santiago-Tirado et al, 2015; Bose et al, 2015 e Peng et al, 2011), insetos (Mauchamp, 2001), plantas (Sambade et al, 2009; Girijashankar e Swathisree, 2009; Plackett et al, 2014 e Raghu et al, 2016), algas (Klemm et al, 2014; Read et al 2013; Mireles, 2014; Suzuki et al, 2015) e animais (Parra et al, 1999; Sinclair et al, 2014 e Pattekar et al, 2015).

Como apresentado na Figura 9, algumas principais parte do equipamento biobalístico da Bio-Rad *Biolistics® PDS-1000/He Particle Delivery* são (a) Botão liga/desliga; (b) botão controlador de vácuo e ventilação; (c) botão de atirar; (d) indicador da pressão do gás hélio; (e) indicador de vácuo; (f) válvulas de controle e de taxa de ventilação e de vácuo; (g) distância entre o disco de ruptura e a tela de parada; (h) distância entre a tela de parada e a placa contendo as células alvo tampa de retenção de disco. O equipamento de biobalística introduz microportadores de tungstênio ou ouro carregados com DNA em células por meio de pressão emitida por gás hélio (Bio-Rad Laboratories; Yadava et al, 2017; Doron et al, 2016).

Na Figura 10 é apresentado o processo de bombardeamento onde o gás hélio pressurizado é liberado por um disco de ruptura – disco de poliamida de diferentes espessuras que se rompe a uma pressão previamente determinada - e acelera as micropartículas (tungstênio ou ouro) previamente cobertas com DNA contendo o gene de interesse em direção a célula alvo a ser transformada. Essas micropartículas carregadas com DNA exógeno são adicionadas ao macroportador – disco de poliamida fino onde o DNA é adicionado - que após o bombardeamento é segurado pela tela de parada (Mauchamp et al,2001;Bio Rad Laboratories).

A velocidade das micropartículas em cada bombardeamento depende da pressão do gás hélio selecionada pelo tipo de disco de ruptura utilizado, a quantidade de vácuo na câmara de bombardeamento, a distância entre o macroportador e a tela de parada, e a distância entre a tela de parada e as células alvo. (Mauchamp et al,2001;Scregg, 2005 e Bio-Rad Laboratories).

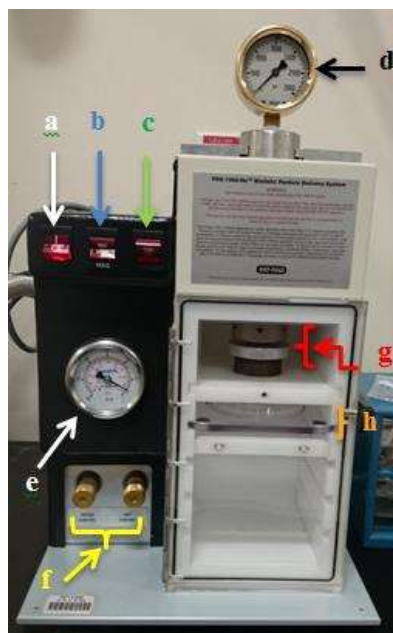


Figura 9: Esquema geral de uma máquina de bombardeamento de micropartículas utilizada durante os experimentos e suas partes(*Biolistics® PDS-1000/He Particle Delivery*). Em (a) Botão liga/desliga; (b) botão controlador de vácuo e ventilação; (c) botão de atirar; (d) indicador da pressão do gás hélio; (e) indicador de vácuo; (f) válvulas de controle e de taxa de ventilação e de vácuo; (g) distância entre o disco de ruptura e a tela de parada ; (h) distância entre a tela de parada e

a placa contendo as células alvo; tampa de retenção de disco; porta da câmara de bombardeamento (figura da autora).

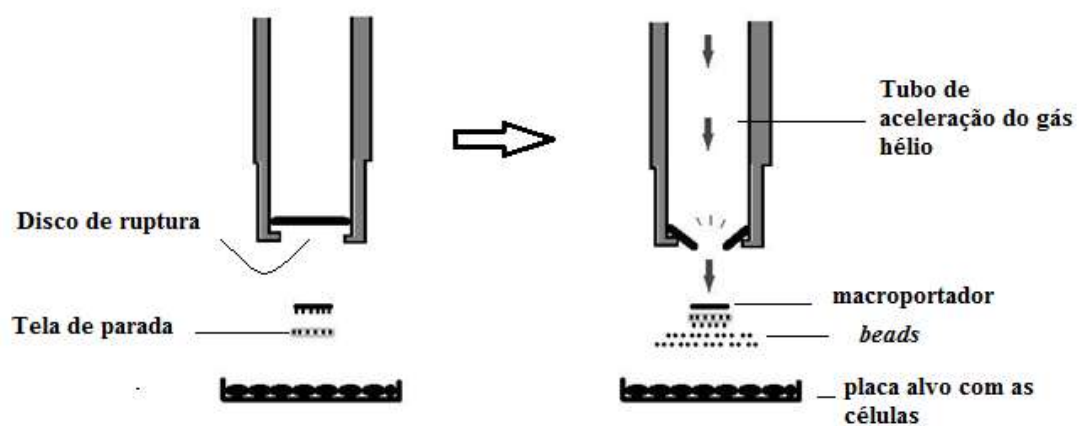


Figura 10: Esquema do processo de bombardeamento de micropartículas. Durante o bombardeamento o gás é passado pelo tubo de aceleração de gás em uma pressão específica que também corresponde ao número de pressão que o disco de ruptura suporta até ele ser rompido; tal pressão atinge o os microportadores revestidos de DNA e consequentemente atingindo as células alvo na placa (adaptado de Bio-Rad Laboratories).

Para otimizar um processo de biobalística pode-se variar os valores de alguns parâmetros tais como o tamanho e tipo de microportador do DNA; a quantidade de vácuo emitida dentro da câmara de bombardeamento; a pressão liberada pelo gás hélio controlada pelo tipo de disco de ruptura a ser utilizado; a distância entre a tela de parada, que segura o macroportador contendo os microportadores carregados com DNA, e a prateleira alvo, que contém a placa ou membrana com as células alvo; a distância entre o disco de ruptura e a tela de parada (Linskens e Jackson, 2003; Mireles, 2014 e Bio-Rad Laboratories).

O microportador de tungstênio é mais barato porém possui forma mais irregular, seu tamanho é considerado bem maior do que o de ouro além de ser considerado tóxico para certos tipos de células e pode oxidar e alterar a ligação do DNA exógeno no DNA da célula receptora. Os microportadores de ouro são mais esféricos e possuem tamanhos mais uniformes, são inertes biologicamente, porém a fixação de DNA em sua superfície varia mais do que em partículas de tungstênio (Cejudo et al, 2008). O tamanho do microportador interfere na velocidade em que ele atingirá a célula alvo e consequentemente na eficiência na inserção do mesmo dentro da célula, ou seja, na eficiência da transformação (Linskens e Jackson, 2003 e Bio-Rad Laboratories).

O vácuo na câmara de bombardeamento reduz o possível arraste das micropartículas durante o bombardeamento. O uso de gás hélio de baixo peso molecular aumenta a aceleração dos microcarreadores com o DNA e também diminuir a força do choque do gás que atinge as

células alvo minimizando o dano celular. A pressão de gás hélio liberada durante o processo também interfere no processo. Essa pressão é controlada pelos discos de ruptura que possuem resistências a determinadas pressões. Uma vez atingido esse limite de pressão esses discos se rompem permitindo essa pressão atravessar os microportadores que com essa força atingem as células alvo. Quanto menor a pressão emitida em direção as células alvo, menor dano será causado as mesmas. (Mauchamp et al, 2001 e Mireles, 2014). Quanto menor a distância entre o disco de ruptura e macroportador, mais forte será o efeito da onda de choque do gás na aceleração no macroportador. Quando se inicia um experimento de otimização de parâmetros, é sugerido que se inicie com a distância maior. Outro parâmetro utilizado para otimizar o processo, é a distância entre a tela de para a prateleira alvo (contém a placa ou membrana com a célula alvo. Quanto menor o nível for colocada a prateleira alvo, maior será a força do choque do gás hélio com os microportadores e DNA atirados nas células alvo (Bio-Rad Laboratories).

Como apresentado na tabela 2, algumas sugestões de valores desses e outros parâmetros para iniciar um processo de otimização de biobalística são densidade celular e osmótica para bactérias, leveduras, células ou tecidos animais, embriões de plantas e algas. Segundo a tabela 2, a fase de crescimento celular varia da fase log para algas, células animais e culturas celulares; meio-log para organelas, estado estacionário precoce para leveduras, e de uma hora a 4 dias para secções de tecidos; a densidade celular a ser colocada no placa ou membrana na prateleira alvo também varia, a osmótica varia somente para bactérias e leveduras e para os outros tipos de tecido não exige nenhuma pressão osmótica; a pressão liberada de vácuo varia de 15 para tecidos animais a 29 para bactérias e de vácuo, a distância do alvo sugerida é de 9 cm para secções de tecidos e culturas de células, 6cm para bactérias, leveduras, algas, embriões de plantas e organelas; a pressão do gás hélio é de 1100 psi para tecidos animais e cultura de células e 1300 psi; o tamanho e o tipo da micropartícula a ser utilizada é partículas de ouro de 0,6 μm para leveduras, algas e organelas, partículas de ouro de 1,6 μm para secções de tecidos e culturas de tecidos animais tecidos, partículas de ouro de 1,0 μm para culturas celulares e embriões de plantas, e uso de tungstênio de 0,7 μm (M5) somente para bactérias (Bio-Rad Laboratories).

Tipo de célula	Fase de crescimento	Densidade da célula	Osmotico m	Vácuo (Hg)	Distância - alvo (cm)	Pressão - Hélio (psi)	Tamanho da partícula
Bactéria	Fase log final e fase estacionária inicial	10^8 – 10^9 por 100mm plate	0.75 sorbitol M	29	6	1,100	0,7 μ m de tungstênio
Levedura	Fase estacionária inicial	10^8 – 10^9 por 100mm plate	0.75 sorbitol e 0.75 M manitol	28	6	1,300	0.6 μ de ouro
Algas	Log	10^8 – 10^9 por 100mm plate	-	29	6	1,300	0.6 μ de ouro
Planta - embriões	-	10 explants por 100mm plate	Nenhum	28	6	1,300	1.0 μ de ouro
- calos ou cultura celular	Log	0.75ml packed cell volume	Nenhum	28	9	1,100	1.0 μ de ouro
Organelas subcelulares	Mid-log	5×10^7 por 100mm plate	Nenhum	28	6	1,300	0.6 μ de ouro
Animal - cultura de tecidos	Log	50-80% confluyente em 35mm plates	Nenhum	15	3	1,100	1.6 μ de ouro
- seções de tecidos	1hr – 4 dias após excisão	400 μ m seções	Nenhum	25	9	1,100	1.6 μ de ouro

Tabela 2: Sugestões de valores de parâmetros as serem otimizados em um processo de biobalística de acordo com o tipo de célula ou tecido (adaptado da Bio-Rad Laboratories).

Dentre as técnicas de transformação disponíveis a biobalística se destaca pela capacidade de grande quantidade de micropartículas de ou tungstênio carregadas com DNA(microportadores) com alta energia cinética penetrarem todas as barreiras celulares independente da rigidez ou da espessura transformar assim qualquer tipo de

célula(Hallmann,2007 e Cejudo et al, 2008). Segundo Hallmann (2007) e Mireles (2014),vários tipos de algas foram transformadas com sucesso por meio da técnica de biobalística:*Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Dunaliella salina*, *Gracilaria changii*, *Laminaria japonica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Navicula saprophila*, *Cyclotella cryptica*, *Euglena gracilis*, *Porphyridium sp.*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Haematococcus pluvialis*, '*Chlorella*' *kessleri*, e *Chlorella sorokiniana* .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das células de *Emiliana huxleyi* para transformação

Cultivou-se as células da microalga *Emiliana huxleyi* cepa CCMP 1516 (antiga *Culture of Marine Phytoplankton 1516* ou atual NCMA_ *National Center for Marine Algae and Microbiota*) oriunda do oceano pacífico na região mais próxima da América do Sul (2.6667° ao Sul e 82.7167° ao oeste) (NCMA), em água fresca do mar (fresh seawater-FSW) de forma a obter a densidade celular de 10^6 células por mL. A água fresca do mar é água do mar filtrada 2 vezes e depois acrescida com $8,82 \times 10^{-4}$ M de NaNO_3 oriundo de uma solução estoque de 75 g/L dH_2O (água destilada); $3,62 \times 10^{-5}$ M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ oriundo de uma solução estoque de 5 g/L dH_2O ; $1,06 \times 10^{-4}$ M de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ oriundo de uma solução estoque de 30 g/L dH_2O ; vitaminas: tiamina (vitamina B1); $2,05 \times 10^{-9}$ M biotina (vitamina H) oriundo de uma solução estoque de 0,1 g/L dH_2O e $3,69 \times 10^{-10}$ M de cobalamina oriundo de uma solução estoque de 1 g/L dH_2O (vitamina B12); elementos traço: $1,17 \times 10^{-5}$ M de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $1,17 \times 10^{-5}$ M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $9,10 \times 10^{-7}$ M de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oriundo de uma solução estoque de 180 g/L dH_2O ; $7,65 \times 10^{-8}$ M $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oriundo de uma solução estoque de 22,0 g/L dH_2O ; $4,20 \times 10^{-8}$ M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oriundo de uma solução estoque de 10,0 g/L dH_2O ; $3,97 \times 10^{-8}$ M de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ oriundo de uma solução estoque de 9,8 g/L dH_2O (BIGELOW). As células foram incubadas à temperatura ambiente sob iluminação artificial constante por cerca de três a quatro dias até a obtenção aproximada de 10^9 células por mL.

Para obter-se uma amostra final de 200 μL de concentrado de células, centrifugou-se a cultura obtida em tubos de centrifuga de 250 mL a 6000 rpm por 12 minutos a 4°C. Após a centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* de células em 1 mL de FSW e transferiu-se para um tubo *ependorf* e centrifugou-se novamente em 13.000 rpm por 8 minutos a 24-26°C, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de FS. Repetiu-se o processo (13.000 rpm por 8 minutos a 24-26°C) duas vezes, sendo que na última ressuspensão foi em 200 μL de FSW que é o volume exato que será adicionado na placa alvo.

Para a obtenção de uma unidade de meio sólido contido na placa alvo, utilizou-se 0,093 g de *Superclear Agar*, 25 mL de *Fresh Seawater* e 8,33 mL de água mili-q (água ultrapura). Marcou-se um círculo de diâmetro de aproximadamente 4 centímetros na da placa para facilitar a visualização de onde se depositaria o concentrado de 200 μL de células obtido na etapa anterior. Em seguida, adicionou-se o concentrado de células dentro do círculo centro marcado e deixou elas secarem em temperatura ambiente em uma cabine de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações.

4.2. Obtenção e preparo do DNA exógeno a ser inserido

Para o processo de transformação por biobalística, foi utilizado o DNA plasmidial PAYCO, que é um plasmídeo sintético criado por Dr. Betsy Read no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade da Califórnia San Marcos (CSUSM). Ele contém o gene de resistência a piromicina e um códon específico que combina com as sequências de DNA da *Emiliania huxleyi* que são utilizadas para transcrever ou produzir proteínas, aumentando as chances da transformação do DNA da mesma. Para multiplicar a quantidade desse plasmídeo foi utilizado um kit de transformação *Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells* (Invitrogen) usando o meio Luria Bertani (*Luria Broth*) sólido, o plasmídeo PAYCO e o antibiótico piromicina para seleção de transformantes. Ao final do processo de transformação recolheram-se as colônias transformadas, ou seja, contendo múltiplos plasmídios PAYCO. Para precipitação do DNA plasmidial adicionou-se 50 µL (10mg/mL) de microportadores *beads* fluorescentes emagnéticos de 0,86µm (Bangs Laboratories, código ME03F) ou de ouro 0.60µm (Bio-Rad Laboratories), 5 µL do DNA plasmidial PAYCO, 2,5 µL CaCl₂ (2,5M), 20 µL espermidina (fixa o DNA nos microportadores). Agitou-se mecanicamente a mistura com vórtex durante 3 minutos e em seguida centrifugou-se a mesma por 2 minutos a 13000 rpm para remover-se o máximo de sobrenadante possível. Em seguida lavou-se com 500µL de etanol 100%. Após a lavagem com etanol, centrifugou-se a mistura por 2 minutos (13000rpm), retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de etanol 100%.

Observação: foram utilizadas micropartículas de ouro como microportadores somente no final da pesquisa quando se constatou a inserção dos *beads* fluorescentes e magnéticos dentro da célula da microalga. Logo, durante a pesquisa o processo de biobalística foi feito utilizando *beads* fluorescentes e magnéticos e no final da mesma utilizou-se micropartículas de ouro. Essa decisão foi tomada baseada na economia desses materiais por seu alto custo.

4.3. Bombardeamento e separação magnética (quando usado *beads* magnéticos)

4.3.1. Bombardeamento

Estabeleceu-se os parâmetros variáveis para otimização do processo apresentados na tabela 3.

Condições	Distancia da abertura (polegadas)	Distância do alvo (cm)	Disco de ruptura (psi)
Padrão 1	1/8	3	900
Padrão 2	3/8	3	900
Padrão 3	1/8	12	900
Padrão 4	3/8	12	900
Padrão 5	1/8	3	1550
Padrão 6	3/8	3	1550
Padrão 7	1/8	12	1550
Padrão 8	3/8	12	1550
Padrão 9	1/4	6	1350
Padrão 10	1/4	9	1350

Tabela 3: Variáveis utilizadas para otimização do processo biobalístico da cepa 1516 da microalga *Emiliana huxleyi*.

Para o procedimento de biobalística é imprescindível que as peças sejam esterilizadas. Por isso, antes de iniciar o processo, esterilizaram-se todas as partes da máquina de biobalística adequadamente. Autoclavaram-se as partes removíveis do equipamento. No interior da máquina: borrifou-se com álcool 70%; esterilizaram-se os discos de ruptura com álcool isopropílico; esterilizaram-se as telas de parada com etanol 100%.

Adicionou-se 10 microlitros da solução de DNA com *beads* no centro do microportador; conectaram-se as peças de acordo com o manual de instrução do equipamento; checou-se os parâmetros variáveis para assegurar se estavam com os corretos discos de ruptura, a pressão do gás hélio, distância do alvo e distância de abertura entre a pressão de bombardeio emitida do disco de ruptura e as micropartículas bombardeadas no microportador; ligou-se a máquina pressionando o botão “on/off” da máquina; pressionou-se o botão de controle de “vácuo ou ventilação” até que a pressão no manômetro permanecesse na posição zero; pressionou-se o botão “atirar” até o manômetro atingir a pressão correspondente ao disco de ruptura e causar o bombardeamento; depois pressionou-se o botão de “vácuo ou

ventilação” para aliviar a pressão no sentido de ventilar a câmara e remover o gás hélio dentro da câmara;

Removeu-se a placa com as células já bombardeadas da máquina, lavou-se imediatamente a região central contendo as células bombardeadas com 1 mL água fresca do mar (*Fresh seawater*).

Foram feitas amostras controle, que não passaram pelo processo de bombardeamento, sendo elas contendo: somente células; células e microportadores de DNA (*beads* fluorescentes magnéticos ou micropartículas de ouro carregados com DNA)misturados; e somente microportadores de DNA (*beads* fluorescentes magnéticos ou micropartículas de ouro carregados com DNA)misturados.

4.3.2. Separação magnética (para as esferas magnéticas)

Transferiram-se as células recuperadas para um tubo *ependorf* posicionado em um separador magnético. Aguardaram-se alguns instantes até que se observar uma “mancha” na parede do *ependorf*, indicando a atração dos *beads* magnéticos e fluorescentes separados do meio de cultura e atraídos pelo ímã do separador, podendo estar dentro das células ou não. Para remoção do concentrado magnético da parede do tubo *ependorf*, removeu-se o meio de cultura com uma micropipeta com cuidado de não remover as esferas (*beads*) fluorescentes magnéticas que foram atraídos para a parede do tubo, ressuspendeu-se o *pellet* separado magneticamente em 0,5-1 mL de *Fresh seawater*.

4.4. Avaliação da técnica de bombardeamento para a inserção de DNA exógeno na microalgae o seu impacto na viabilidade por meio da citometria de fluxo e microscopia fluorescente

Após o processo de separação magnética, encaminharam-se as amostras para a análise no citômetro de fluxo para contagem e detecção da fluorescência da clorofila presente nas células e a fluorescência das esferas magnéticas fluorescentes. Estabeleceu-se a plotagem dos gráficos (citogramas) selecionando no *SSC* versus *FSC* (complexidade ou granulometria das partículas versus tamanho das partículas); *FL3* versus *FSC* (canal de fluorescência da clorofila versus tamanho das partículas) e *FL3* versus *FL1* (canal de fluorescência da clorofila versus canal de fluorescência dos *beads* fluorescentes magnéticos). Nos citogramas de *SSC* versus *FSC* selecionou-se cerca de 99,5% a 100% da região correspondente ao tamanho e granulometria das células e *beads* coletados.

Foram feitas micrografias de luz e fluorescente utilizando um microscópio fluorescente para avaliar as mostras que tiveram um resultado positivo de acordo com os gráficos gerados no citômetro de fluxo e revelar a localização dos *beads* em relação as células. Foram tiradas imagens com 40X de aumento, a autofluorescência da clorofila foi detectada utilizando um filtro TRICI enquanto os *beads* foram detectados utilizando um filtro *YGFP* (filtro de cor azul que entrar em contato com a fluorescência amarela dos *beads* gera uma imagem com os *beads* na coloração verde). A luz branca foi utilizada para visualização da posição das células e dos *beads*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizou-se do citômetro de fluxo para analisar a eficiência da possível inserção dos *beads* fluorescentes magnéticos na célula da microalga *Emiliania huxleyi*. Os citogramas gerados pelo *software* de um citômetro de fluxo fornecem a contagem e o tamanho das células, a complexidade ou granulometria interna da célula e a fluorescência emitida pelas partículas e/ou células presentes nas amostras. Logo a autofluorescência emitida da clorofila pode ser detectada por essa técnica ao mesmo tempo em que detecta a fluorescência das esferas (*beads*) magnéticas fluorescentes. Para a interpretação dos citogramas gerados é necessário compreender seus eixos:

- FSC (Forward Scattered Light) ou Dispersão de Luz Direta fornece uma estimativa da superfície ou do tamanho das células;
- SSC (Side Scattered Light) ou Dispersão de Luz Lateral corresponde a complexidade ou granulometria interna da célula;
- FL1 representa o canal a fluorescência amarela *beads* fluorescentes e magnéticos;
- FL3 representa o canal detecta fluorescência verde ou a autofluorescência da clorofila da microalga.
- O quadrante que corresponde a concomitância das maiores intensidades das fluorescências emitidas da clorofila (canal *FL3*) e do *bead* fluorescente magnético (canal *FL1*) é o quadrante Q4-UR, localizado no canto superior direito dos citogramas de *FL1* versus *FL3*. Assim pode-se dizer que altas porcentagens no quadrante Q4-UR corresponde as grandes quantidades de possíveis células transformadas, pois os *beads* fluorescentes magnéticos e as células estão coincidindo na mesma região.

Após recolhidas as partículas contidas na amostra pelo citômetro, é gerado o primeiro citograma de SSC versus FSC, onde possibilita a seleção da região onde as partículas de interesse, células e os *beads*, se encontram : pequeno tamanho (menores índices de FSC) e baixa granulometria interna (menores índices de SSC). Esta seleção é mostrada na figura 11 em C1(A), onde a amostra recolhida foi um controle contendo a mistura de células e *beads* que passaram por todo processo, porém não foram bombardeados. O processo de seleção da região de interesse foi feito com todas as amostras, sempre abrangendo de 99 a 100% do total de partículas recolhidas pelo citômetro. Em C1(A), C1 (B) e C1 (C) tem-se respectivamente SSC versus FSC, FL3 versus FSC e FL3 versus FL1 da amostra controle da mistura de células

e beads (não bombardeada). O citogramas C2 e mostra FL3 versus FL1 das controles contendo somente células e o C3 mostra FL3 versus FL1 da amostra controle contendo somente o pellet dos beads. O citograma denominado Exp 6 indica o resultado para amostra do padrão 6, sendo Exp 6 (A) FL3 versus FL1 do sobrenadante da amostra.

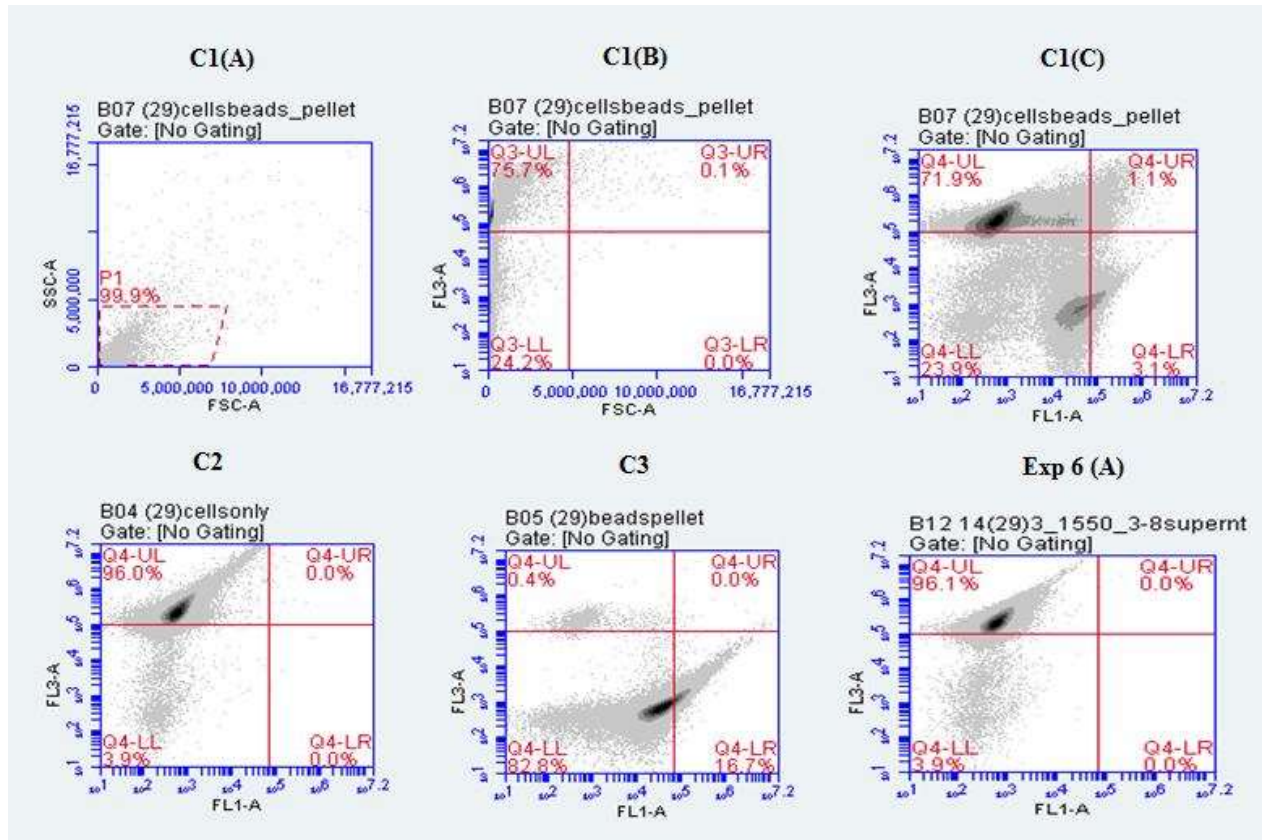


Figura 11: Citogramas gerados de amostras bombardeadas de acordo com os padrões pré- estabelecidos na tabela 1 e das amostras controles. Em C1(A), C1 (B) e C1 (C) tem-se respectivamente SSC versus FSC, FL3 versus FSC e FL3 versus FL1 da amostra controle da mistura de células e beads (não bombardeada). O citogramas C2 e mostra FL3 versus FL1 das controles contendo somente células e o C3 mostra FL3 versus FL1 da amostra controle contendo somente o pellet dos beads. O citograma denominado Exp 6 indica o resultado para amostra do padrão 6 (900 psi; 3 cm; 3/8 in), sendo Exp 6 (A) FL3 versus FL1 do sobrenadante da amostra.

Em C1(B) é mostrado um citograma da mesma amostra controle citada anteriormente (mistura de células e beads, sem bombardeamento), exibindo a intensa fluorescência da clorofila emitida pelo canal FL3 correspondente ao pequeno tamanho das células (FSC). O quadrante Q3-UL do citograma C1(B) mostra que 75,7 % das partículas (células e beads) selecionadas em no citograma C1(A) possui alta intensidade de emissão da autofluorescência da clorofila, comprovando a viabilidade celular com a mistura das células com os beads antes do bombardeamento. Já no citograma C1(C) representado por FL3 versus FL1 da amostra controle da mistura de células e beads, exibe o quadrante de interesse para o estudo: o

quadrante Q4-UR, que é a região onde tanto a fluorescência dos *beads* quanto a autofluorescência da clorofila coexistem. Como a amostra controle não foi bombardeada, o valor percentual dessa região indica um falso positivo. Logo, a porcentagem encontrada nessa região será o valor subtraído das porcentagens dos quadrantes Q4-UR das amostras bombardeadas. Observando o quadrante Q4-UL do citograma C2, constata-se que 96% da região selecionada do citograma *SSC* versus *FSC* da amostra controle contendo somente células (não exibida na figura 11) não continha nenhum sinal de fluorescência amarela (canal *FL1*) oriunda dos *beads*, emitindo somente a autofluorescência da clorofila (canal *FL3*) indicando que as células estavam vivas antes da mistura com os *beads* e do bombardeamento. O citograma C3 representa *FL1* versus *FL3* da amostra controle contendo somente *beads*. No quadrante Q4-LR do citograma C3 mostra que 16,7% da região selecionada do citograma *SSC* versus *FSC* da amostra controle contendo somente *beads* (não mostrado na figura 11) sugeriu que existiam *beads* que não estavam emitindo fluorescência os outros exibiam alta intensidade de emissão de fluorescência amarela (*FL1*). O citograma apresentado em Exp 6(A) é do sobrenadante da amostra do padrão 6, com os eixos *FL3* versus *FL1*, que mostra a eficiência da separação magnética: sem alta intensidade da fluorescência dos *beads* (*FL1*) e somente fluorescência da clorofila (*FL3*), representando um resultado coerente uma vez que os *beads* devem ser encontrados somente no *pellet* formado pela atração do ímã do separador magnético.

A figura 12 mostra os citogramas de *SSC* versus *FSC* do *pellet* da amostra 6 (900 psi; 3 cm; 3/8 in) indicado por Exp 6 (B), *FL3* versus *FSC* do *pellet* da amostra 6 indicado por Exp 6 (C) e *FL3* versus *FL1* do *pellet* da amostra 6 indicado por Exp 6 (D). Nos citogramas Exp 1, Exp 2 e Exp 3 tem-se *FL3* versus *FL1* do *pellet* das amostras dos padrões 1, 2 e 3.

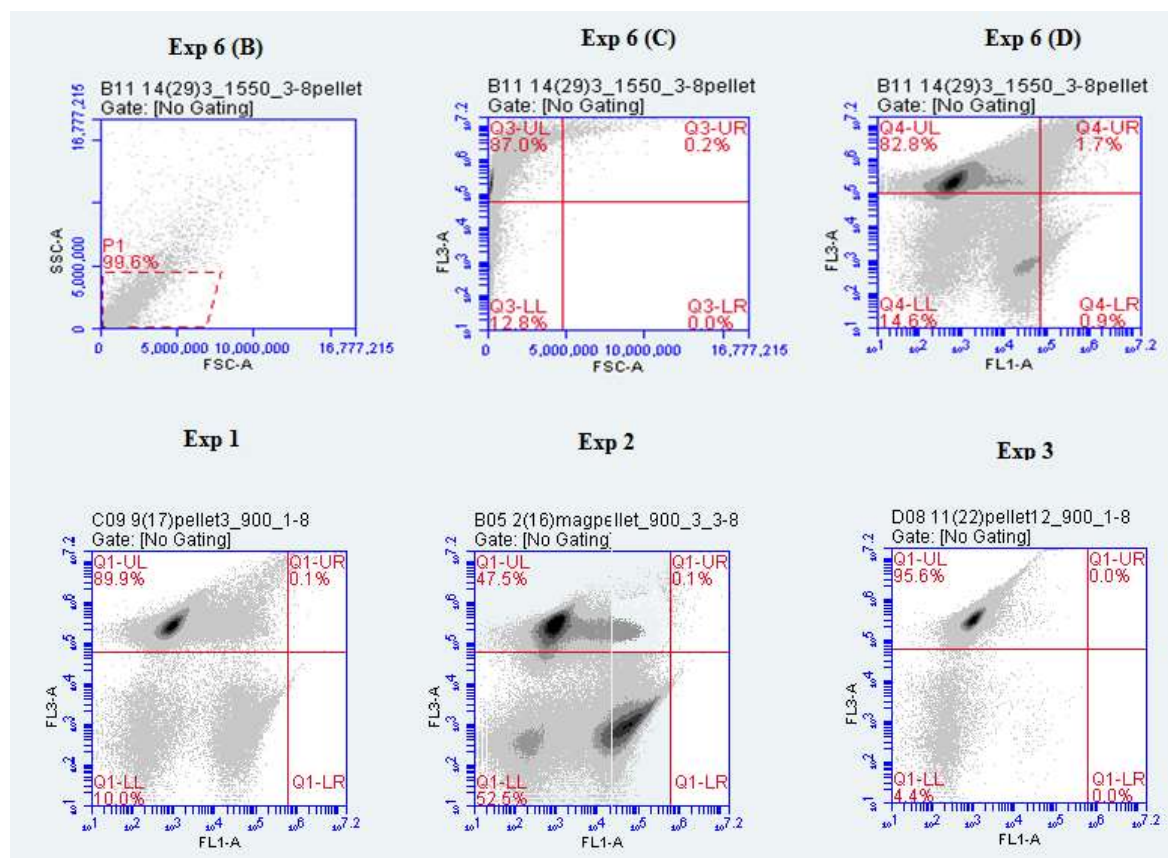


Figura 12: Citogramas gerados de amostras bombardeadas de acordo com os padrões pré- estabelecidos na tabela 1 e das amostras controles. O citogramas indicado por Exp 6 (B) representa *SSC* versus *FSC* do *pellet* da amostra 6(900 psi; 3 cm; 3/8 in), o citograma Exp 6 (C) mostra *FL3* versus *FSC* do *pelleteo* Exp 6 (D) *FL3* versus *FL1* do *pellet* da amostra 6 . Nos citogramas Exp 1, Exp 2 e Exp 3 tem-se *FL3* versus *FL1* do *pellet* das amostras dos padrões 1, 2 e 3.

A porcentagem de 99,6% selecionada para análise dos citogramas *FL1* versus *FL3* e *FL3* versus *FSC* da amostra padrão 6, apresentados na figura 12, mostram que esse valor está dentro da faixa de seleção estipulada para análise (99 a 100%). No citograma Exp 6 (C) mostra a que 97% das 99,6% das células selecionadas no citograma Exp 6 (B) emitem alta intensidade de autofluorescência da clorofila, indicando a alta porcentagem de células vivas dessa amostra recolhida. O citograma Exp 6 (D) não exibe no quadrante Q4-UR a diferença percentual com o falso positivo correspondente a amostra controle da mistura de beads e células do citograma C1(C) na figura 11. Portanto, o valor percentual do quadrante Q4-UR da amostra padrão 6 que contém possíveis células transformadas é de $1,7 - 1,1 = 0,6\%$. Analisando e comparando o quadrante Q4-UR do citograma Exp 6 (D) com as outras amostras bombardeadas 1,2 e 3, observa-se que este alcançou a maior porcentagem na região Q4-UR do que estes citogramas .

A Figura 8 exibe os citogramas de FL3 versus FL1 das amostras padrões 4, 5, 7, 8, 9 e 10. As porcentagens das amostras padrões de 4, 7- 10 possuem 0% da região Q4-UR e que a amostra 5 da amostra possui somente 0.1%.

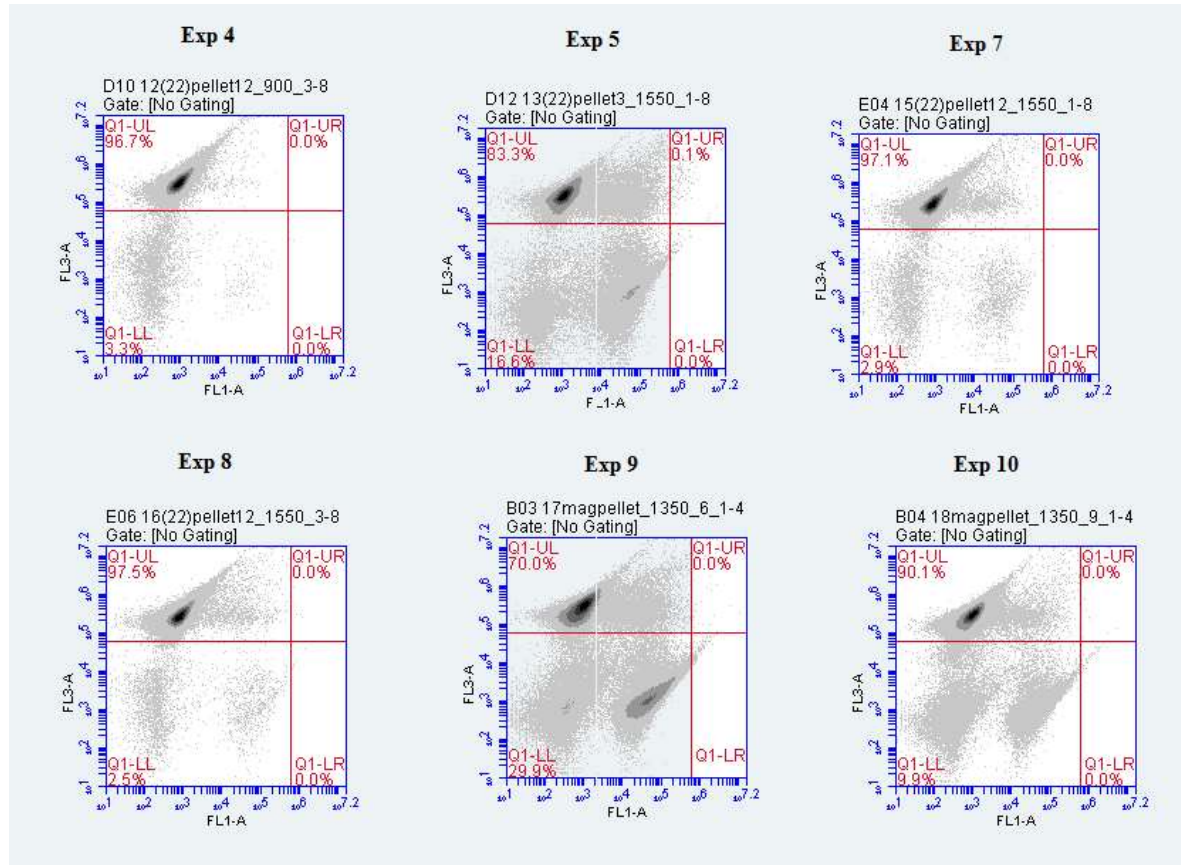


Figura 13: Citogramas gerados de amostras bombardeadas de acordo com os padrões pré- estabelecidos na tabela 1 e das amostras controles. Nos citogramas Exp 4, Exp 5, Exp 7, Exp 8, Exp 9 e Exp 10 tem-se FL3 versus FL1 do *pellet* das amostras dos padrões 4, 5, 7, 8, 9 e 10.

Analisando e comparando o quadrante Q4-UR do citograma Exp 6 (D) da figura 11 com as amostras bombardeadas da figura 13 (Exp 4, Exp 5 e Exp 7-10), observa-se que este alcançou a maior porcentagem na região Q4-UR do que estes citogramas.

A alta porcentagem na região Q4-UR indica que os *beads* podem estar tanto dentro da célula ou aglutinados em sua superfície, mas não garante a inserção dos mesmos. Essa aglutinação pode ser causada pela geração de polissacarídeos pela alga durante o estresse do processo formando uma espécie de “cola” para os *beads* em sua superfície (MC., LC. E IW., 1998; Read et al, 2013 e W. Decho e Gutierrez, 2017). Isso é um problema porque gera mais falsos positivos para o processo. A microscopia de fluorescência auxilia para observar a

localização exata dos *beads* das células verificando a inserção dos mesmos e a sobrevivência das células após processo (viabilidade celular).

A figura 14 mostra imagens obtidas do microscópio ótico de fluorescência da amostra com melhor resultado da citometria, o padrão 6 (900 psi; 3 cm; 3/8 in), com 40X de aumento. Em (A) foi utilizado um filtro TRICI para detectar a autofluorescência da clorofila, gerando uma imagem com as clorofilas das células na coloração vermelha, em (B) foi utilizado a microscopia ótica de contraste fase normal, exibindo as células e os *beads* presentes na amostra e em (C) mostra somente os *beads* da amostra na coloração verde devido a utilização de um filtro YGFP, um filtro azul que ao entrar em contato com a fluorescência amarela dos *beads* gera a coloração verde.

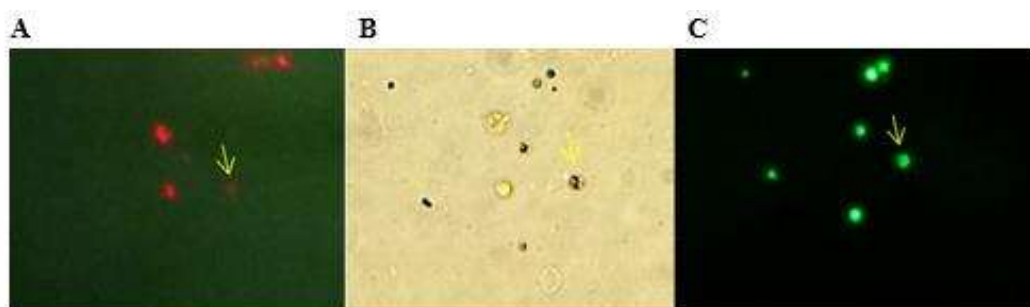


Figura 14: Micrografias de luz e fluorescente comprovando a inserção de um *bead* fluorescente magnético dentro de uma célula de *Emiliana huxleyi*. As imagens foram tiradas do exp 6 (900 psi; 3 cm; 3/8 in) com 40X de aumento. Em (A), é indicado células vivas por exibirem a autofluorescência da clorofila na cor vermelha. As mesmas células sob microscopia de contraste de fase normal são mostradas em (B). Os *beads* fluorescentes e magnéticos são visíveis dentro da célula marcada por uma seta em (C). A autofluorescência da clorofila foi detectada utilizando um filtro TRICI enquanto os *beads* foram detectados utilizando um filtro YGFP que é um filtro de cor azul que entrar em contato com a fluorescência amarela dos *beads* gera uma imagem com os *beads* na coloração verde (figura da autora).

Em (B) pode-se observar a posição de uma célula contendo um *bead* em seu interior. Em (A), foi comprovado que essa célula está viva com o uso de um filtro detector da autofluorescência da clorofila (TRICI) na cor vermelha. Em (C) mostra que é de fato um *bead* fluorescente e magnético localizado no interior dessa célula com o uso de um filtro de cor azul que ao entrar em contato com a fluorescência amarela dos *beads* gera uma imagem com os *beads* na coloração verde. Logo, pela microscopia fluorescente pode-se comprovando a inserção de um *bead* fluorescente magnético dentro da célula da microalga *Emiliana huxleyi* mostrando que a inserção de um microportador de tungstênio ou de ouro carregado de DNA

exógeno também é possível. A Figura 8 mostra que o uso de biobalística para transformar a cepa 1516 da microalga é possível.

6. CONCLUSÃO

Não foi possível determinar as condições ótimas de bombardeamento utilizando o citômetro de fluxo para detectar a penetração dos *beads*. Porém, pelas observações pelo microscópio de fluorescência, constatou-se a inserção dos *beads* dentro da célula da microalga *Emiliana huxleyi* a sobrevivência da mesma após os processos de estresse. Isso comprova que o método de biobalística para inserção de DNA exógeno dentro da cepa 1516 (sem cocoólitos) da microalga *Emiliana huxleyi* é possível.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho demonstrou ser possível a inserção do plasmídeo PAYCO em *Emiliana Huxleyi* pela técnica de bombardeamento, mas não avaliou a transcrição do gene exógeno. Para tal, deve-se bombardear as células com ouro 0,6 µm revestidas de DNA plasmidial sintético PAYCO, contendo o gene de resistência a piramicina e sequências que se liguem efetivamente as sequências da microalga e cultivar as células bombardeadas nessas condições em meio sólido (contendo piramicina) após o processo para testar a viabilidade celular a produção de células transformadas. Se elas crescerem no meio contendo o antibiótico significa que as células foram transformadas com sucesso e são viáveis para outras finalidades de uso. Um tratamento das células com uma enzima de degradação de polissacarídeos (polissacaridases) depois do processo de bombardeamento pode melhorar os resultados falsos positivos gerados pela aglutinação dos beads em polissacarídeos liberados pelas células (Maere; Jensen; Eilertsen, 2016; Hayes e Blaerkley, 2017; Salmeán et al, 2017). Modificar algumas variáveis como a idade celular, diâmetros das partículas e os números de células pipetadas no diâmetro da placa de ágar visando aumentar a eficácia do processo de transformação por biobalística.

8. REFERÊNCIAS

ANDERSSON, D.; HUGHES, D. **Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance**. 2017. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5435765/>>. Acesso em: 07/06/17.

ARSHAD, M.; ASAD, S. **Silicon Carbide Whisker-mediated Plant Transformation, Properties and Applications of Silicon Carbide**, Prof. Rosario Gerhardt (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/15721. 2011. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/properties-and-applications-of-silicon-carbide/silicon-carbide-whisker-mediated-plant-transformation>>. Acesso em: 31/03/17.

BAJGUZ, A. et al. **Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects**. 2017. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28487674>>. Acesso em: 31/05/17.

BAKER, A.L. et al. **Chrysosphaerella (Chrysophyceae)**. Phyco Key, University of New Hampshire Center for Freshwater Biology. 21 de maio de 2013. Disponível em: <http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Synurophyceae/CHRYSOSPHERELLA/Chrysosphaerella_Image_page.html>. Acesso em: 31/03/17.

BAKKE, B. et al. **Exposure to Fibres, Crystalline Silica, Silicon Carbide and Sulphur Dioxide in the Norwegian Silicon Carbide Industry. 2008. Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2488379/>>. Acesso em: 02/06/17.

BIGELOW (National Center for Marine Algae and Microbiota). **f/2 Medium**. Disponível em: <https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_f_2_1.pdf>. Acesso em: 02/06/17.

BIO-RAD LABORATORIES, LifeScience Group. **Inc. Biolistics® PDS-1000/He Particle Delivery System Instruction Manual**, Número do catálogo 165-2257. Bio-Rad. Disponível em: <www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1652249.pdf>. Acesso em 31/08/16.

BIO-RAD LABORATORIES, LifeScience Group. **Transfections Methods Overview**. Disponível em: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10-0826_transfection_tutorial_interactive.pdf>. Acesso em 06/03/17.

BLACK, B. **Climate Change an Encyclopedia of Science and History**. 2013. V.1. ABC-CLIO.

BORROR, C. et al. **Probability and Statistics in Engineering**. 4. Ed. 2003. Editora John Wiley & Sons, Inc.

BOSE, I. et al. **Biolistic Transformation of a Fluorescent Tagged Gene into the Opportunistic Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans***. 2015. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4401375/>>. Acesso em: 31/05/17.

CEJUDO, A; FERNÁNDEZ, E.; LEÓN, R. **Transgenic Microalgae as Green Cell Factories**. 2008. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=8wIU6PdwaKYC&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s>. Acesso em: 19/06/17.

CHANG, J. et al. **A Holistic Approach to Managing Microalgae for Biofuel Applications**. 2017. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297844/>>. Acesso em: 31/05/17.

CHATTOPADHYAY, A. et al. **Enhancement of Lipid Productivity in Oleaginous *Colletotrichum* Fungus through Genetic Transformation Using the Yeast *CtDGAT2b* Gene under Model-Optimized Growth Condition**. 2014. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25375973>>. Acesso em: 07/06/17.

Department of Geological, Miami University, 2017. Disponível em: <<http://www.as.miami.edu/geology/about-the-department/cesare-emiliani/>>. Acesso em: 07/06/17.

DORON, L. et al. **Transgene Expression in Microalgae—From Tools to Applications (electro boil silic).** 2016. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4840263/>>. Acesso em: 30/05/17.

DUNAHAY TG. **Transformation of Chlamydomonas reinhardtii with silicon carbide whiskers.** Biotechniques. 1993 Sep;15(3):452-5, 457-8, 460. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8217158>>. Acesso em: 30/05/17.

GIRIJASHANKAR, V.; SWATHISREE, V. **Genetic transformation of *Sorghum bicolor*.** 2009. NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550352/pdf/12298_2009_Article_33.pdf>. Acesso em: 31/05/17.

GROOM, S., Plymouth Marine Laboratories. ***Emiliania huxleyi* bloom south of Cornwall (UK).** 1999. Disponível em: <http://ina.tmsoc.org/galleries/colourcoccos/source/z00-1_bloom_summer_99_.htm>. Acesso em: 31/08/16.

GROSSER, J. et al. **Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops.** 2014. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4596326/>>. Acesso em: 07/06/17.

HALLMANN, A. **Algal Transgenics and Biotechnology.** Transgenic Plant Journal ©2007 Global Science Books; Department of Cellular and Developmental Biology of Plants, University of Bielefeld, Universitätsstr. 25, D-33615 Bielefeld, Germany. Disponível em: <<https://www.uni-bielefeld.de/biologie/Zellbiologie/publik/paper/2007tpj.pdf>>. Acesso em: 19/06/17.

HAYES, M.; BLEAKLEY, S. **Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production.** 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5447909/>>. Acesso em: 19/06/17.

HORNE, J.; KERA, S.; AGERWALA, S. **The Temporal Resolution of *In Vivo* Electroporation in Zebrafish: A Method for Time-Resolved Loss of Function.** 2009.

NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860033/>>. Acesso em 02/06/17.

KLEMM, J. et al. **A Tyrosine-Rich Cell Surface Protein in the Diatom *Amphora coffeaeformis* Identified through Transcriptome Analysis and Genetic Transformation.** 2014. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4220933/>>. Acesso em: 31/05/17.

LINSKENS, H.; JACKSON, J. **Genetic Transformation of Plants.** 2003. p. 164 e 165. Springer.

MAERE, H.; JENSEN, I.; EILERTSEN, K. **Enzymatic Pre-Treatment Increases the Protein Bioaccessibility and Extractability in Dulse (*Palmaria palmata*).** 2016. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5128739/>>. Acesso em: 19/06/17.

MAUCHAMP, B. et al. **A helium burst biolistic device adapted to penetrate fragile insect tissues.** 2001. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC355893/>>. Acesso em: 31/05/17.

MERICO, A.; TYRELL, T. **Emiliania huxleyi: bloom observations and the conditions that induce them.** Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact. 2004. p 75-93. Springer.

MIRELES, Gabriella. **Optimizing Micro-particle Bombardment Parameters for the Marine Algae *Emiliania huxleyi*.** 16 de maio de 2014. Disponível em: <<http://csusm-dspace.calstate.edu/handle/10211.3/120747>>. Acesso em 31/08/16.

MONTGOMERY, D.; RUNGER, G. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros.** 4. Ed. 2009. Editora LTC.

MYSTIKOU, A. et al. **Algal Cell Factories: Approaches, Applications, and Potentials.** 2016. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5192462/>>. Acesso em: 07/06/17.

NCMA (National Center for Marine Algae and Microbiota). **CCMP1516 *Emiliania huxleyi***. Disponível em: <<https://ncma.bigelow.org/ccmp1516#.WTFJyevyIU>>. Acesso em: 02/06/17.

PARKER, J.; MARTINKO, J.; MADIGAN, M. **Biology of Microorganisms**. 8. ed. 1997. Editora Prentice Hall.

PARRA, A. et al. **Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment**. 1999. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC17577/>>. Acesso em: 31/05/17.

PATTEKAR, A. et al. **A microarray MEMS device for biolistic delivery of vaccine and drug powders**. 2015. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4635881/>>. Acesso em: 31/05/17.

PENG, G. et al. **Genetically altering the expression of neutral trehalase gene affects conidiospore thermotolerance of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum***. 2011. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045870/>>. Acesso: 31/05/17.

PETER, G.; AZENCOTT, H.; PRAUSNITZ, M. **Influence of the Cell Wall on Intracellular Delivery to Algal Cells by Electroporation and Sonication**. 2007. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094718/>>. Acesso em: 31/05/17.

PLACKETT, A. et al. **High-Efficiency Stable Transformation of the Model Fern Species *Ceratopteris richardii* via Microparticle Bombardment**. 2014. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4012588/>>. Acesso: 31/05/17.

RAGHU, E. et al. **Biolistic transformation of *Scoparia dulcis* L.** 2016. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4840147/>>. Acesso em: 31/05/17.

RAJENDRAN, A.; HU, Bo. **Mycoalgae biofilm: development of a novel platform technology using algae and fungal cultures**. 2016. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4886447/>>. Acesso em: 31/05/17.

RASALA, B. et al. **Biofuels from algae: challenges and potential**. 2011. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3152439/>>. Acesso em: 31/05/17.

RAVEN. **Biologia Vegetal**. 8. ed. 2014. Editora Guanabara Koogan LTDA.

READ, Betsy et al. **Pan genome of the phytoplankton, *Emiliana underpins its global distribution***. Revista *Nature*, vol 499, p 209–21,11 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v499/n7457/abs/nature12221.html>>. Acesso em: 31/08/2016.

READ, Betsy. **Betsy Read**. CSU Fresca. Disponível em: <<https://fresca.calstate.edu/faculty/2662>>. Acesso em 21/04/17.

REBOURS, C. et al. **Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process**. 2012. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3665214/>>. Acesso em: 31/05/17.

RUBINSKY, B. et al. **Synergistic Combination of Electrolysis and Electroporation for Tissue Ablation**. 2016. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4750947/>>. Acesso em: 30/05/17.

SALMEÁN, A. et al. **Insoluble (1 → 3), (1 → 4)-β-D-glucan is a component of cell walls in brown algae (Phaeophyceae) and is masked by alginates in tissues**. 2017. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460208/>>. Acesso em: 19/06/17.

SAMBADE, A. et al. **Inhibition of Tobacco Mosaic Virus Movement by Expression of an Actin-Binding Protein**. 2009. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663746/>>. Acesso em: 31/05/17.

SANTIAGO-TIRADO, F. et al. **A Single Protein S-acyl Transferase Acts through Diverse Substrates to Determine Cryptococcal Morphology, Stress Tolerance, and Pathogenic**

Outcome. 2015. NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430228/>. Acesso em: 31/05/17.

SAUCY, A. et al. **Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants.** 2017. NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5250645/>. Acesso em: 07/06/17.

SCIANDRA, A. et al. **The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae.** 2015. NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4364489/>. Acesso em: 31/05/17.

SCREGG, A. **Enviromental Biotechonology.** 2ed. 2005. p 24,358,359,360,394 e 412. Oxford University Press. Editora Oxford, Grã-Bretanha.

SHIRAIWA, Y. et al. **Quantitative Analysis of Carbon Flow into Photosynthetic Products Functioning as Carbon Storage in the Marine Coccolithophore, *Emiliania huxleyi*.** 2015. NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4486895/>. Acesso em: 31/05/17.

SIMMONS, M.; SNUSTAD, P. **Principles of Genetics.** 5. ed. 2009. Editora Wiley.

SINCLAIR, J. et al. **Culturing *Caenorhabditis elegans* in Axenic Liquid Media and Creation of Transgenic Worms by Microparticle Bombardment.** 2014. NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500161/>. Acesso em: 31/05/17.

SLONCZEWSKI, J.; FOSTER, J. **Microbiology: An Evolving Science.** 3. ed. 2013. W. W. Norton.

SMITH, A. et al. **Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding.** 2016. NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5387034/>. Acesso em: 31/05/17.

STASI, C.; BORGES, F.; IORIO, F. **ELETROPORAÇÃO: UMA REVISÃO.** Revista Fisioterapia Ser – Ano 2 – Nr 2 – abr/mai/jun – 2007. Disponível em:

<http://www.proffabioborges.com.br/artigos/eletroporacao_uma_revisao.pdf>. Acesso em: 02/06/17.

SUZUKI, K. et al. **Effect of an Introduced Phytoene Synthase Gene Expression on Carotenoid Biosynthesis in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum***. 2015. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4557025/>>. Acesso em: 31/05/17.

TWEED, C. et al. **Algae biodiesel - a feasibility report**. 2012. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3332261/>>. Acesso em: 31/05/17.

VAZ, B. et al. **Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae**. 2015. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538420/>>. Acesso em: 30/05/17.

WALKER, A. et al. **Pest control and resistance management through release of insects carrying a male-selecting transgene**. 2015. Biomed Central. Disponível em: <<https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-015-0161-1>>. Acesso em: 07/06/17.

WORTHY, A. et al. **Coccolithophores: Functional Biodiversity, Enzymes and Bioprospecting**. 2011. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3124974/>>. Acesso em: 19/06/17.

YADAVA, P. et al. **Advances in Maize Transformation Technologies and Development of Transgenic Maize**. 2017. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5216042/>>. Acesso em: 30/05/17.

YAMAGISHI-COSTA, J. et al. **Apostila de Sistemática de Criptógamas**. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). p 25-28. 2017. Disponível em: <http://www.criptogamas.ib.ufu.br/sites/criptogamas.ib.ufu.br/files/file/Apostila_de_Sistemática_de_Criptogamas2.pdf>. Acesso em: 19/04/17.

YAO, G. et al. **Synergistic and Dose-Controlled Regulation of Cellulase Gene Expression in *Penicillium oxalicum*.** 2015. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567317/>>. Acesso em: 07/06/17.

YUSOFF, F. M. et al. **Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production.** 2015. NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4385614/>>. Acesso em: 30/05/17.