

BOLETIM

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

biotecnologia

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Série 2 . Número 5 . Junho de 2014 . Publicação Quadrimestral ISSN 1645-5878



Biotechnologia Azul

Ultracongeladores
-86°C da Eppendorf



Ficará Congelado!

Ultracongeladores Eppendorf New Brunswick

Há mais de 30 anos que os Ultracongeladores Eppendorf New Brunswick são referência no mercado, já que nenhum outro congelador oferece a mesma combinação de alto desempenho, segurança para as suas amostras, conveniência e eficiência energética. **Ficará congelado com os Ultracongeladores Eppendorf New Brunswick!**

- > **Congeladores HEF®** - os energeticamente mais eficientes e amigos do ambiente do mercado*.
- > **Congeladores Innova®** - até 30% de mais capacidade interna que outros congeladores do mesmo tamanho.
- > **Congeladores Premium** - proteção adicional para as sua amostras, a um preço mais económico.



www.eppendorf.com/freezers

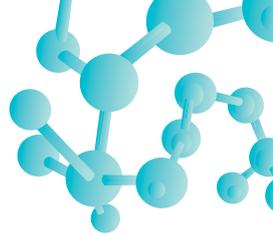
Contactos:

Eppendorf Ibérica S.L.U. · Tel.: +34 91 651 76 94 · E-mail: eppendorf-portugal@eppendorf.pt

* Com base em testes internos e estudos de mercado realizados a 1 de Setembro 2011.

HEF® e Innova® são marcas registadas da New Brunswick Scientific Co., Inc., EUA. Eppendorf® e New Brunswick™ são marcas registadas da Eppendorf AG, Alemanha. Todos os direitos reservados, incluindo gráficos e imagens. Copyright © 2014 by Eppendorf.





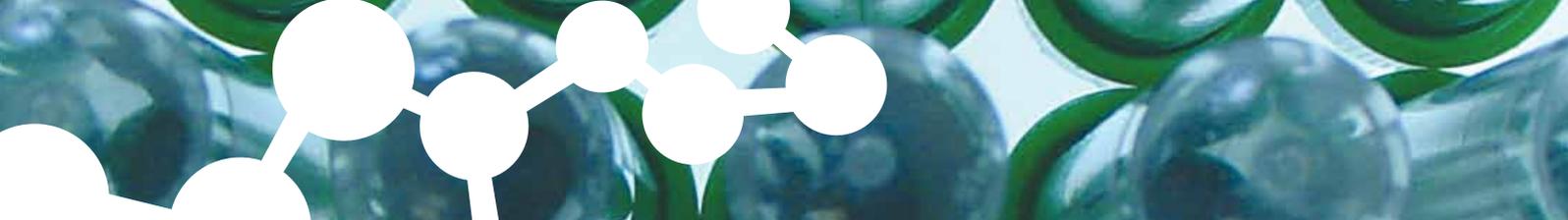
Em 2012, reconhecendo a importância da Economia do MAR, a EU identificou o crescimento AZUL como área estratégica, tendo definido 5 domínios de intervenção preferencial: aquacultura, energia azul, turismo, recursos minerais marinhos e biotecnologia. Em Portugal, o impacto social, tecnológico e económico da Economia do MAR será enorme, uma vez que é um dos países do mundo com a mais extensa zona económica exclusiva (ZEE).

A aplicação da Biotecnologia é, sem dúvida, uma das principais componentes no desenvolvimento da Economia do MAR tendo dando origem ao que hoje se chama BIOTECNOLOGIA AZUL. As aplicações biotecnológicas relacionadas com organismos de origem marinha deixaram de pertencer a uma área que apresentava um promissor potencial de desenvolvimento, tendo-se transformado numa atividade em franco crescimento ao nível mundial, com um sólido retorno tanto comercial como em termos de soluções inovadoras.

Neste contexto e na continuação do seu esforço para divulgar o que é feito em Portugal em áreas importantes da Biotecnologia, a SPBT achou por bem dedicar um número da sua revista à Biotecnologia Azul. Esperamos que este número contribua para evidenciar a quantidade e a qualidade do trabalho que tem vindo a ser desenvolvido pela comunidade científica portuguesa nesta área fundamental para o desenvolvimento da economia portuguesa.

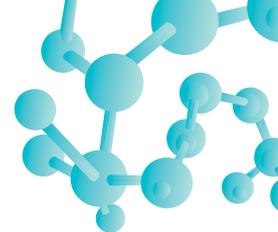
José Teixeira
(Presidente da SPBT)

Contamos com todos para uma
SPBT dinâmica e participativa



Índice

- 1 Editorial**
José A. Teixeira; Presidente da SPBT
- 3 O projeto de extensão da plataforma continental - (mais) oportunidades para a biotecnologia azul**
Frederico Carvalho Dias, Aldino Santos de Campos
- 6 Biotecnologia marinha: Um setor emergente no âmbito do Cluster do Conhecimento e Economia do Mar**
Ana Teresa Luís, Frederico Ferreira, Rui Azevedo
- 8 Os oceanos e a biotecnologia marinha: um novo desafio para Portugal**
João Varela, Hugo Pereira, Eunice Santos, Ivo Monteiro, Cheila Tocha, Luísa Custódio, Luísa Barreira
- 11 Produtos naturais: a riqueza incalculável dos micro-organismos marinhos**
Pedro N. Leão, Vitor Vasconcelos
- 14 Potencial biotecnológico do mar dos Açores**
Maria do Carmo Barreto, Ana Seca, Ana Costa, Ana Neto, Nelson Simões
- 16 Cultivo de macroalgas nos Açores... Oportunidades e desafios**
Rita F. Patarra, Alejandro H. Buschmann, Maria H. Abreu, Ana I. Neto
- 19 As macroalgas marinhas dos Açores e o seu valor nutricional**
Lisete Paiva, Elisabete Lima, Ana I. Neto, José Batista
- 22 Macro e microalgas como fonte natural de pigmentos**
M. M. Sampaio, Alexandra Cruz
- 24 Cianobactérias como fontes de compostos naturais de interesse biotecnológico**
Vitor Vasconcelos
- 27 Biotecnologia de microalgas marinhas: produtos e serviços**
Teresa Lopes da Silva, Alberto Reis
- 31 Esponjas marinhas: do mar à farmácia**
Ana I. S. Esteves, Rodrigo Costa
- 35 Isolamento e seleção de estirpes locais de *Haematococcus pluvialis* Flotow para produção de astaxantina**
E. D. Xavier, J. Furnas, J. M. Azevedo, A. Reis, L. Teves, G. Mota, A. I. Neto
- 37 Hidrolisados proteicos com atividade biológica: uma alternativa para a valorização de subprodutos de pescado**
Irineu Batista, Carla Pires, Bárbara Teixeira, Maria Leonor Nunes
- 40 Bioprospeção de inibidores de DNase I para aplicação no desenvolvimento de vacinas de DNA**
Salomé Magalhães, Duarte M. F. Prazeres, Inge W. Nilsen, Gabriel A. Monteiro
- 44 Produção de esqualeno e ácidos gordos polinsaturados por microrganismos do grupo dos Thraustochytrids**
Irineu Batista, Gabriel Martins, Maria Padilha, Maria do Castelo Paulo, Narcisa M. Bandarra
- 47 Biorremediação de contaminantes em ambientes costeiros e estuarinos**
Ana P. Mucha, C. Marisa R. Almeida
- 50 A ponte entre a escola e a ciência azul**
Costa, R. L., Geraldês, D., equipa IPMA, equipa EMEPC



O projeto de extensão da plataforma continental - (mais) oportunidades para a biotecnologia azul

Frederico Carvalho Dias, Aldino Santos de Campos

EMEPC- Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental, Rua Costa Pinto 165, 2770-047 Paço de Arcos, Portugal

E-mail: frederico.dias@emepc.mam.gov.pt

Biotecnologia Azul: o futuro já começou

As aplicações biotecnológicas relacionadas com organismos de origem marinha deixaram de pertencer a uma área que apresentava um promissor potencial de desenvolvimento, tendo-se transformado numa atividade em franco crescimento ao nível mundial, com um sólido retorno tanto comercial como em termos de soluções inovadoras. Por direito próprio, e evidenciando a sua importância, esta área é atualmente referida sob a sugestiva designação de Biotecnologia Azul.

Há vários exemplos de sucesso que são amplamente conhecidos, desde o Prialt, um analgésico para dores crónicas desenvolvido a partir de uma toxina produzida por um búzio marinho; o AZT, a primeira droga licenciada para o tratamento do VIH-SIDA, isolada a partir de uma esponja do Mar das Caraíbas, ou, com a mesma origem, o Acyclovir, que desempenha um papel fundamental no tratamento das infeções por herpes; passando pelos cosméticos (que hoje em dia quase não dispensam a utilização, e publicidade, de produtos com origem marinha); até enzimas utilizadas em bio-reactores industriais, por exemplo, na produção de etanol a partir do milho, não esquecendo o grande avanço que constituiu a introdução das polimerases de DNA atualmente utilizadas na maioria dos laboratórios, que foram pela primeira vez isoladas a partir de microorganismos provenientes de fontes hidrotermais [1].

Por outro lado, uma pesquisa rápida no *Google Scholar* de entradas que contenham as palavras *Marine biotechnology* mostra que a partir dos 6400 registos (não incluindo citações) obtidos para o ano 2000 ocorreu um crescimento, a uma taxa aproximadamente constante, para 17800 registos em 2013 (filtrando pela expressão exata «*Marine biotechnology*» obtém-se um crescimento semelhante, de 900 para 2400 registos entre 2000 e 2013, respetivamente). Estes resultados são corroborados pelo número de patentes relacionadas com recursos marinhos genéticos, tendo ocorrido um crescimento de cerca de 70% entre 1998 e 2007 [1].

A extensão da plataforma continental

A 11 de maio de 2009 Portugal submeteu ao Secretário Geral das Nações Unidas a proposta nacional de extensão da plataforma continental para além das 200 milhas marítimas [2]. A proposta de extensão, preparada pela Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental (EMEPC), será apreciada por uma subcomissão (que, espera-se, será

brevemente constituída) da Comissão da Limites da Plataforma Continental (CLPC), a qual emitirá recomendações sobre aquela. Sendo estas recomendações de cariz positivo, Portugal deverá então declarar, através de legislação nacional, e publicitar os limites exteriores da sua plataforma continental, encerrando, deste modo, o processo de forma final e vinculativa [2].

Portugal possui uma das maiores Zonas Económicas Exclusivas (ZEE) da União Europeia, estendendo-se até às 200 milhas marítimas medidas a partir das linhas de base (essencialmente, definidas pela linha de costa nacional). Os correspondentes leito e subsolo marinhos (excluindo a zona até às 12 milhas pertencentes ao mar territorial) definem a plataforma continental e gozam de um regime jurídico próprio. O processo de extensão respeita à determinação do limite exterior da plataforma continental para além das 200 milhas marítimas, não envolvendo a coluna de água sobrejacente, que faz parte do mar alto, ou seja, de águas internacionais.

Importa, desde já, clarificar três aspetos relacionados com a submissão da proposta de extensão da plataforma continental. Em primeiro lugar, Portugal não se encontra de forma solitária ou unilateral neste processo, que decorre no quadro da Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar (CNUDM). A Convenção entrou em vigor em 1994 e foi entretanto já ratificada por 162 dos 193 Estados-Membros da ONU, tendo a ratificação pela parte de Portugal ocorrido em

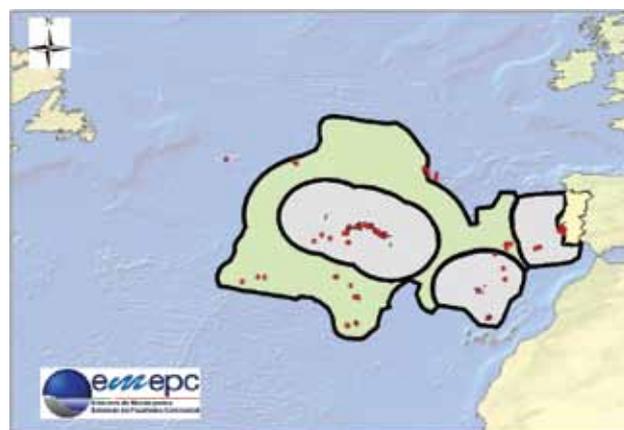


Figura 1 – A plataforma continental de Portugal. As zonas a cinzento correspondem à ZEE, cujo leito e subsolo marinhos pertencem à plataforma continental até às 200 milhas marítimas medidas a partir das linhas de base; a zona a verde corresponde à plataforma continental estendida para além das 200 milhas, cuja proposta de limite exterior foi submetida à ONU em 2009. Os pontos a vermelho representam os mergulhos efetuados pelo ROV “Luso” entre 2008 e 2013.

1997. Neste contexto, a primeira proposta de extensão foi submetida pela Federação Russa em dezembro de 2001 e em abril de 2014 foi submetida pelo Reino de Tonga a septuagésima terceira proposta (a proposta portuguesa constituiu a quadragésima quarta submissão) [3].

Em segundo lugar, deve-se salientar que o conceito de plataforma continental vertido na CNUDM diverge, embora nele se inspire, do conceito geológico homónimo. Com efeito, enquanto este último corresponde a uma zona adjacente às massas continentais terrestres (emersas) caracterizada por um declive diminuto que se desenvolve tipicamente até aos 200m de profundidade, no âmbito da CNUDM a plataforma continental corresponde a um conceito de natureza jurídica [2,4], apesar de baseado em conceitos com origem nas geociências. Em particular, no que respeita à sua extensão para além das 200 milhas marítimas, o estado costeiro tem que determinar e identificar o que, em termos simplificados, pode ser considerado o correspondente prolongamento natural do seu território emerso. Para tal objetivo faz-se uso de regras bem definidas do ponto de vista jurídico, e que são implementadas com recurso à informação técnica e científica decorrente das propriedades morfológicas, geológicas e geofísicas das zonas marinhas envolvidas. Deste modo, a proposta de extensão da plataforma continental submetida à ONU por Portugal abrange a área de cerca de 2150000km² de leito e subsolo marinhos do Atlântico representada na figura 1.

A terceira característica fundamental do processo de extensão decorre do Artigo 77 da CNUDM, que estabelece que «o estado costeiro exerce direitos [exclusivos] de soberania sobre a plataforma continental para efeitos [da sua exploração e] de exploração e aproveitamento dos seus recursos naturais». Estes recursos naturais compreendem «os recursos minerais e outros recursos não vivos do leito do mar e subsolo, bem como os organismos vivos pertencentes a espécies sedentárias, isto é, aquelas que no período da captura estão imóveis no leito do mar ou no seu subsolo ou só podem mover-se em constante contacto físico com esse leito ou subsolo». Por último, o Artigo 77 garante ainda que os direitos, anteriormente mencionados, «do estado costeiro sobre a plataforma continental são independentes da sua ocupação, real ou fictícia, ou de qualquer declaração expressa». Esta última disposição da CNUDM implica que, de certo modo, os recursos naturais presentes na plataforma continental portuguesa “aguardam” o desencadear da iniciativa nacional conducente ao aproveitamento e desenvolvimento do enorme potencial científico, tecnológico e económico que representam.

A capacidade nacional instalada

No que respeita aos recursos marinhos com interesse biotecnológico, a plataforma continental nacional apresenta um elevado potencial, decorrente da grande diversidade de habitats e ambientes existentes, alguns deles extremos [2]. Desde já, as profundidades envolvidas, com um valor médio de 3000m, e que podem atingir quase 6000m, garantem, por si só, que os organismos presentes no leito e subsolo marinhos

desenvolveram, ao longo da sua história evolutiva, uma série de adaptações que lhes permitem suportar os correspondentes valores gigantescos de pressão, mais de cem vezes superiores aos da pressão atmosférica, bem como as baixas temperaturas características das grandes profundidades oceânicas. Entre montes submarinos que, abaixo da zona eufótica, apresentam vastas coberturas de esponjas e jardins de coral, que formam habitats estruturantes nos quais proliferam os mais variados tipos de macro e meso-fauna; extensas e inexploradas planícies abissais; e fontes hidrotermais, que expelem águas, a quase 100°C, saturadas de metais pesados e outros elementos habitualmente tóxicos, locais onde, apesar de a luz lá não chegar devido à grande profundidade, a vida se desenvolve graças a bactérias e archaea quimiossintéticas que formam a base da teia trófica local. A vasta extensão de território enquadrada pela plataforma continental de Portugal possui uma biodiversidade marinha notável.

Durante os trabalhos de caracterização geofísica e geológica realizados pela EMEPC, no âmbito do Projeto de Extensão da Plataforma Continental (PEPC), tornou-se necessária a recolha de amostras rochosas com a determinação rigorosa da respetiva posição (*i.e.*, das coordenadas) de amostragem e do respetivo contexto geológico local. Por forma a colmatar esta necessidade, em 2008 a EMEPC adquiriu e começou a operar um ROV (Remotely Operated Vehicle), ou veículo submarino de operação remota, o ROV “Luso”, concebido para trabalhar até aos 6000m de profundidade [2]. Este ativo estratégico permitiu que, pela primeira vez, Portugal passasse a ter acesso operacional a todo o espaço marítimo sob sua jurisdição.

Uma das grandes vantagens do ROV “Luso” é a versatilidade que a sua estrutura modular proporciona (figura 2). Assim, para além da amostragem geológica no contexto do PEPC que motivou a sua aquisição, o “Luso” permite também a amostragem biológica, estando ainda equipado com um sistema de aspiração ligado a um conjunto (rotativo) de câmaras de amostragem independentes. As recolhas de água (também com interesse microbiológico) realizadas através de garrafas Niskin instaladas na estrutura do ROV, e fechadas seletivamente a partir da cabine de controlo, bem como os dados registados pelo CTD (sensor de condutividade, temperatura e pressão) e pelos sensores de oxigénio, CO₂ e metano, permitem fazer a caracterização físico-química do local. Acresce que as rochas recolhidas no leito marinho estão geralmente cobertas de organismos, o que faz com que o primeiro processamento efetuado sobre as amostras geológicas seja, na realidade, de natureza biológica. Quando, após cada mergulho, o ROV “Luso” regressa ao convés do navio, as amostras biológicas são triadas, processadas, catalogadas e armazenadas (o que poderá incluir o congelamento rápido com azoto líquido e preservação a -80°C) em função dos protocolos adotados.

Conclusão

Desde 2008 que a EMEPC tem realizado campanhas oceanográficas envolvendo o ROV “Luso”. Após a submissão de 2009, os trabalhos no âmbito do PEPC têm continuado, por



Figura 2 – O ROV “Luso” a iniciar um mergulho. São visíveis as garrafas Niskin, o tubo do sistema de aspiração, um dos braços robóticos e vários sensores.

forma a garantir-se a recolha de dados suplementares que enriqueçam e permitam consolidar a informação que suporta a proposta de extensão.

Na figura 1 estão também indicados os locais nos quais foram realizados mergulhos com o ROV “Luso”, entre 2008 e 2013. As amostras obtidas encontram-se nas instalações da EMEPC e têm sido utilizadas por vários investigadores nacionais e estrangeiros. A participação de cientistas, de várias instituições, nestas missões tem sido também uma prática comum, procedendo-se a amostragens direcionadas para os seus projetos de investigação.

Urge agora que o país (as suas comunidades científica, tecnológica e industrial) incremente significativamente a sua capacidade operacional oceânica, por forma a amplificar as atividades de exploração e investigação, que, apesar de significativas, são ainda residuais. Especialmente no que diz

respeito à biotecnologia, deverão ser estabelecidas prioridades e estratégias a médio e longo prazo, compatíveis com as escalas temporais desta área (ao longo de todo o ciclo, desde a identificação e síntese até à produção e comercialização em grande escala), que sustentem o início de atividades de bioprospeção na plataforma continental e a potencial exploração posterior. Na verdade, o primeiro passo nesse sentido encontra-se já dado através da importância que é atribuída à Biotecnologia Azul na Estratégia Nacional para o Mar 2013-2020 recentemente adotada [5].

Quando se compara o valor da área total coberta pelos 113 mergulhos do ROV “Luso” com o valor global de 3811000km² da plataforma continental portuguesa (figura 1), torna-se evidente que a quase totalidade desta última é completamente desconhecida e está por explorar. Com efeito, no século XXI a última fronteira do planeta Terra é constituída pelos fundos oceânicos. Portugal já lá está!

Referências

- [1] Leary D, Vierros M, Hamon G, Arico S, Monagle C (2009) Marine genetic resources: A review of scientific and commercial interest. *Marine Policy* 33: 183-194.
- [2] Abreu MP, Coelho PN, Lourenço N, Santos de Campos A, Conceição P, Costa R, Carvalho Dias F, Calado A, Martins MA, Neves M e Restante Equipa EMEPC (2012) Extensão da Plataforma Continental. Um Projeto de Portugal – Seis anos de missão (2004-2010). EPUL. ISBN 978-989-95249-2-7.
- [3] http://www.un.org/Depts/los/clcs_new/commission_submissions.htm (accedida em 29 de abril de 2014)
- [4] Coelho PN (2011) How Legal is Article 76's Continental Margin? *Maria Scientia* 1: 101:112.
- [5] Resolução do Conselho de Ministros n.º 12/2014, Diário da República, 1ª série – N.º 30 – 12 de fevereiro de 2014.



genes & enzymes
www.nzytech.com | info@nzytech.com

NZYTech main goal is to provide customers worldwide with the highest quality genes, enzymes and kits at competitive prices. NZYTech aims to keep a reputation in the fields of Molecular Biology, Complex Carbohydrate Enzymology, Food and Feed Analysis and Clinical Diagnostics, through the provision of Preparative and Analytical Test Kits, Genes and Enzymes.

Molecular biology

NZYTech continuously develops new products for molecular biology applications.



CAZYmes

NZYTech expertise on CAZYmes has more than 20 years, and it offers a large portfolio of plant cell wall degrading enzymes.



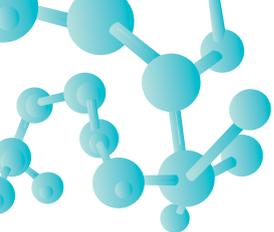
Analytical products

NZYTech offers a wide range of enzymes and enzymatic test kits for the quantification of important analytes by the Agrofood Industry



All NZYTech activities are developed under the ISO 9001:2008 certification.





Biotecnologia marinha: um setor emergente no âmbito do Cluster do Conhecimento e Economia do Mar

Ana Teresa Luís, Frederico Ferreira, Rui Azevedo

OCEANO XXI - Associação para o Conhecimento e Economia do Mar

UPTec – Pólo do Mar, Avenida da Liberdade S/N, 4450-718 Leça da Palmeira, Matosinhos

Uma importante consequência da pressão demográfica é o rápido consumo dos recursos vivos de forma não sustentável, impedindo a sua renovação, estando muitas espécies seriamente em risco devido à sobre-exploração, particularmente as resultantes da pesca ilegal não regulamentada ou não reportada, ou no melhor dos casos por práticas pouco seletivas e ineficazes. Estas ameaças ao Oceano implicam a existência de novos modos de cooperação e a execução de medidas adaptáveis e de princípios de gestão eficazes. Existe hoje um pensamento estratégico na conceptualização de políticas de governação, gestão e valorização do Oceano à escala global e europeia, ao desenvolver esforços para destacar a importância da componente mar no quadro das prioridades políticas da União Europeia (EU), contidas na Estratégia “Europa 2020”. De igual modo, Portugal tem desenvolvido um papel muito ativo no desenvolvimento da Política Marítima Integrada (PMI), um eixo central para o desenvolvimento e valorização do mar, assim como da Estratégia Marítima para o Atlântico. Em 2007, Portugal foi pioneiro no estabelecimento de um paradigma de boas práticas de governação sustentável e sustentada do Oceano com a criação da primeira área marinha protegida (AMP) no alto mar [1]. Um marco decisivo foi também a apresentação a 11 Maio de 2009 da proposta portuguesa da extensão da plataforma continental junto da ONU e a sua apresentação em 2010, à Comissão de Limites da Plataforma Continental (CLPC). Em 2011, sob forte impulso de Portugal, foi lançada em Lisboa a Estratégia Marítima para o Atlântico que integrou as orientações da Estratégia “Europa 2020” e apresentou uma nova visão da Europa Marítima, virada para a proteção e exploração do potencial de longo prazo do Oceano, promovendo uma maior eficácia no uso dos recursos num quadro de exploração sustentada e sustentável. Já em 2012, a UE apresentou uma comunicação dedicada ao “Crescimento Azul” que define e caracteriza a “Economia Azul”. O crescimento azul identifica 5 domínios estratégicos de intervenção preferencial: aquicultura, energia azul, turismo, recursos minerais marinhos e a biotecnologia azul [1]. A biotecnologia pode ser definida como o conjunto dos instrumentos e processos que utiliza organismos vivos (ou partes de organismos) para produzir ou modificar produtos, alterar plantas ou animais, ou desenvolver microrganismos para fins específicos [2].

É neste contexto da valorização dos recursos marinhos (e também marítimos) que a OCEANO XXI tem uma função ativa

na dinamização do Cluster do Conhecimento e da Economia do Mar, Estratégia de Eficiência Coletiva-Cluster reconhecido pelo COMPETE, em 2009. Pretende-se, assim, promover o desenvolvimento de relações de cooperação entre instituições do setor científico, empresarial e entidades associativas, dos diferentes setores e atividades, cuja área funcional final é o mar. Este Cluster envolve um vasto e diversificado conjunto de entidades representativas dos interesses regionais e nacionais, pertencentes aos principais setores do agregado económico subjacente a esta estratégia de eficiência coletiva, tendo em vista a diversificação da base económica nacional, criando, desta forma, novas atividades e serviços e fomentando o aparecimento de mercados alternativos com maior valor económico, o reforço da competitividade e da produtividade das indústrias do mar, a internacionalização e o aumento do emprego qualificado. Como uma das linhas prioritárias, encontra-se a promoção da qualidade e a valorização dos produtos da pesca, da aquicultura e dos produtos marinhos e a segurança alimentar, onde se insere portanto a biotecnologia marinha.

A OCEANO XXI tem associados com projetos na área da biotecnologia: Centros de investigação: (CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro, CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, INEGI - Instituto de Engenharia Mecânica e Gestão Industrial, IPL - Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche, ESB - Escola Superior de Biotecnologia, U. Católica, CCMAR - Centro de Ciências do Mar, IPVC - Instituto Politécnico de Viana do Castelo, 3Bs Research Group - Universidade do Minho) e empresas (por exemplo, Algalplus, Testa & Cunhas - SA, Soja de Portugal).

Anualmente, organiza o “Fórum do Mar”, um evento internacional que integra: I) Exposição/mostra de produtos, Serviços e de Tecnologias com aplicação ao Mar; II) Encontros de Negócio, onde é organizado um programa de reuniões entre as Empresas e Centros de I&D participantes no “Fórum do Mar” e um grupo de entidades/contactos internacionais, onde o objetivo é proporcionar momentos estruturados de contacto de forma a favorecer o reforço da internacionalização da Economia do Mar; III) Conferências e *workshops* sobre diversas temáticas relacionadas com o setor (ambiente, segurança marítima, náutica e turismo náutico, biotecnologias, aquicultura, etc.). Este ano com especial destaque para

a realização de um *workshop* no tema da aquacultura e a sustentabilidade da Economia do Mar, em particular na valorização de subprodutos do pescado. Vai também realizar-se um seminário de um projeto em biotecnologia marinha: “AtlanticBlueTech – Imagine the marine bio-resources’ setor for 2014-2020”, uma parceria constituída por 8 entidades, provenientes de 5 países do Atlântico.

Outro foco de ação deste Cluster é a organização dos “Open days do Mar”, eventos organizados em parceria com a PRO-DUTECH - Pólo das Tecnologias de Produção, em empresas líder do setor da indústria das fileiras do mar, para uma plateia constituída por empresas da fileira das tecnologias de produção e por entidades do Sistema Científico e Tecnológico Nacional que visam identificar soluções, capacidades e competências que respondam às necessidades das empresas que acolhem estes eventos e explorar oportunidades de cooperação, seja no âmbito da I&D, Inovação ou Transferência de Tecnologias. O inverso aplica-se nos “Infodays”, onde uma empresa tem um determinado produto que poderá ter valor para outras empresas e/ou entidades do Sistema Científico e Tecnológico que se deslocam à empresa para conhecer as ofertas que a mesma tem para oferecer.

Em simultâneo com a organização dos eventos atrás referidos, a OCEANO XXI encontra-se a participar ativamente em 2 projetos europeus. Um já mencionado atrás, o “AtlanticBlueTech”, que tem como principal objetivo a promoção e desenvolvimento do setor dos biorecursos marinhos ao nível do Espaço Atlântico, de forma cooperativa e concertada. Agregando agentes de inovação e de desenvolvimento económico, autoridades locais e organizações científicas, este projeto visa capitalizar outros projetos e iniciativas previamente desenvolvidas sob este tema. Os parceiros do projeto irão identificar os principais obstáculos para o desenvolvimento do setor e definir medidas corretivas, procurando contribuir também para a implementação operacional do plano de ação adotado no quadro da Estratégia Marítima para o Atlântico. Um outro projeto, o “REMCAP - Resource Efficient Maritime Capacity”, tem como objetivos facilitar a interação e troca de conhecimento entre os diferentes Clusters membros: França, Irlanda, Lituânia, Portugal, Suécia e Reino

Unido, promovendo a inovação na eficiência dos recursos marítimos, onde se insere a biotecnologia azul com vista à exploração comercial de organismos marinhos, estruturas ou material genético.

A biotecnologia marinha constitui um setor do conhecimento ainda recente e que, por isso, se deve considerar como um domínio de investigação em desenvolvimento. Contudo, o que de novo tem surgido, tem surpreendido os cientistas, pois no âmbito do desenvolvimento da biotecnologia marinha, existem várias oportunidades: transformação de compostos de organismos marinhos em bioprodutos com aplicações industriais, farmacêuticas, nutricionais, médicas, cosméticas e tecnológicas, valorização dos produtos da pesca, promovendo sinergias entre as infraestruturas laboratoriais nacionais, criação de um repositório de amostras biológicas e ainda a produção de biocombustíveis através de macro e microalgas [3].

Neste contexto, este Cluster tem detetado dificuldades: obtenção de financiamento estável, estabelecimento de uma comunicação eficaz entre a comunidade de biotecnologia marinha e os setores público e privado da indústria, formação e treino do pessoal para tornar possível essa cooperação, e a promoção e a imagem do sector de uma forma individualizada.

Torna-se necessário investigação científica e desenvolvimento de tecnologias capazes de viabilizarem economicamente o aproveitamento prático das potencialidades latentes no nosso espaço marítimo [4].

Bibliografia

- [1] “Estratégia Nacional para o Mar 2013-2020”. Fevereiro 2014.
- [2] Comissão Estratégica dos Oceanos; “Um Desígnio Nacional para o Século XXI (Parte II)”; Lisboa, 2004.
- [3] Blue Growth for Portugal – Associação Portugal: Uma visão empresarial da economia do mar”, realizado pelo autor para a COTEC Empresarial para a Inovação no período de setembro de 2011 a novembro de 2012.
- [4] “O Hypercluster da Economia do Mar”. Um domínio de potencial estratégico para o desenvolvimento da economia portuguesa. Relatório Final. 17 de fevereiro de 2009.



spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Visite o nosso site
www.spbt.pt



Os oceanos e a biotecnologia marinha: um novo desafio para Portugal

João Varela, Hugo Pereira, Eunice Santos, Ivo Monteiro, Cheila Tocha, Luísa Custódio, Luísa Barreira

Centro de Ciências do Mar do Algarve (CCMAR), Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

E-mail: jvarela@ualg.pt

Resumo

Portugal é um dos países do mundo com a mais extensa zona económica exclusiva (ZEE), tendo esta um forte impacto na economia, emprego e turismo. Porém, é urgente criar novas oportunidades de emprego qualificado ligado ao mar, podendo a biotecnologia marinha dar um forte contributo nesse sentido. Uma das linhas de investigação mais promissoras nesta área é a produção de biocombustíveis a partir de microalgas marinhas. Para tal, o CCMAR desenvolveu uma metodologia de alto rendimento para o rastreio de algas com a capacidade de produzirem níveis elevados de lípidos para a produção de biocombustíveis líquidos. Esta abordagem culminou no isolamento de uma alga verde, robusta, de rápido crescimento e com elevada capacidade de produção de lípidos com um perfil adequado para a produção de biodiesel. No entanto, a implementação do conceito de biorrefinaria será essencial para que os biocombustíveis a partir de lípidos de microalgas se tornem numa realidade comercial.

Abstract

Portugal is a country with one of the world's most extensive Exclusive Economic Zones (EEZ), which has a strong impact on its economy, employment and tourism. However, it is urgent to create novel opportunities for skilled employment connected to the sea. Marine biotechnology can make a strong contribution towards this goal. One of the most promising lines of research in this area is the production of biofuels from marine microalgae. For this purpose, CCMAR has developed a methodology for high-throughput screening of microalgae with the ability of accumulating high levels of lipids for the production of liquid biofuels. This approach enabled us to isolate a robust, fast-growing, lipid-rich green alga with a suitable fatty acid profile for biodiesel production. However, the implementation of the biorefinery concept will be essential for microalgae-based biofuels to become a commercial reality.

Oceanos, Portugal e a Biotecnologia Marinha

Os oceanos cobrem cerca de 72% da superfície do nosso planeta, exibindo uma elevada biodiversidade que engloba animais, ervas marinhas, macro- e microalgas, bactérias, arqueões e vírus. Em suma, todos os grandes domínios da vida estão presentes neste habitat global, o qual possui variados ecossistemas—desde abismos com mais de 11.000 m de profundidade e fontes hidrotermais meso-oceânicas, até salinas onde células microscópicas conseguem sobreviver a concentrações de NaCl perto do ponto de saturação. No que respeita a Portugal, estima-se que a ZEE tenha uma área total de $1,7 \times 10^6$ Km² [1]. Porém, a 11 de maio de 2009, Portugal apresentou uma candidatura à extensão da sua ZEE para além das atuais 200 milhas, podendo a área total atingir 4×10^6 Km² em que mais de 97% corresponde a superfícies oceânicas [2].

O impacto económico e social dos oceanos em Portugal é inegável, sendo responsável por mais de 10% do Produto Interno Bruto (PIB), 90% das receitas do turismo e 12% do emprego [1]. No entanto, é urgente que o valor acrescentado da economia do mar aumente de modo a criar mais emprego qualificado, em particular para os jovens, e assim evitar a sua saída e o conseqüente impacto na demografia e sustentabilidade da nossa economia e bem estar social. Uma

das estratégias para conseguir este objetivo é desenvolver e apostar na biotecnologia marinha. Neste momento, uma linha de investigação que é bastante promissora nesta área científico-tecnológica corresponde ao desenvolvimento de biocombustíveis de origem marinha.

Biocombustíveis de origem marinha (BOM)

Apesar de existirem várias tentativas para o lançamento de automóveis elétricos por parte de governos e fabricantes, a sua adoção pelos consumidores tem sido baixa. A autonomia limitada, o recarregamento demorado e os elevados custos de aquisição / substituição de baterias que fornecem energia ao motor elétrico têm sido algumas das causas para o relativo insucesso deste tipo de veículos. Além disso, a reduzida densidade energética das atuais baterias, quando comparadas com a dos combustíveis líquidos, impede a utilização generalizada de motores elétricos em transportes pesados terrestres, aéreos e marítimos [3]. Uma vez que a nossa economia depende em larga medida deste tipo de transportes, não só para deslocações e comércio, mas também para a distribuição de bens mais básicos para a sobrevivência humana (por exemplo, alimentos), o desenvolvimento de alternativas renováveis aos combustíveis fósseis deve ser uma prioridade nacional. Como os veículos elétricos não

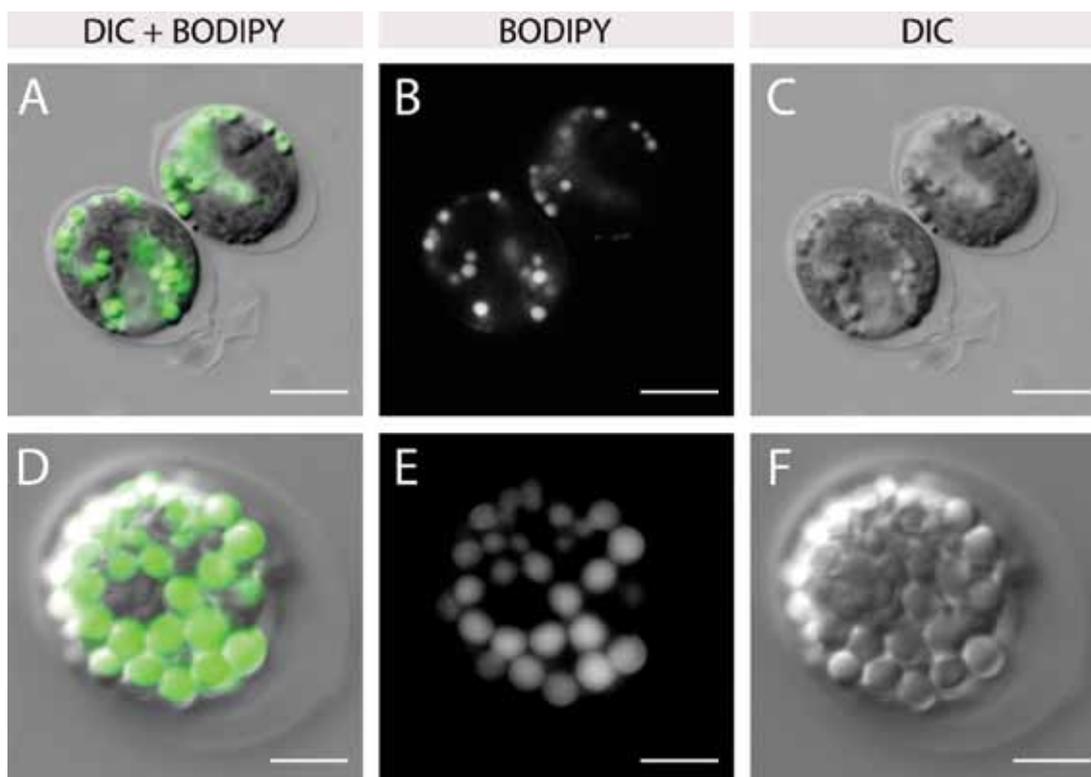


Figura 1 – Estirpe CTP4 em crescimento exponencial (A-C) e sob depleção de nutrientes (D-F) em que os glóbulos lipídicos corados com BODIPY têm uma forma circular com fundo branco (B,E) ou um fundo verde na imagem composta (A,D) com a obtida por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), onde é visível a morfologia celular (C,F). A barra de escala corresponde a 5 μ m.

são uma solução viável para o transporte pesado e com o fim previsível dos combustíveis fósseis, a aposta deverá ser em combustíveis de origem renovável, ou seja, biocombustíveis.

Atualmente a União Europeia tem suprido a necessidade de biocombustíveis através da utilização de plantas terrestres oleaginosas. No entanto, a sua utilização em larga escala é impensável e insustentável em termos de produtividade ou impactos ecológicos e económico-sociais. A necessidade de elevadas áreas de cultivo e água de regadio para obter suficiente biomassa para preencher as necessidades de biocombustíveis dentro e fora da União Europeia provocaria um aumento generalizado do preço dos alimentos. A competição por terra arável e recursos hídricos combinada com o aumento da procura de biomassa alimentar devido ao crescimento da população mundial e produção de biocombustíveis é algo expectável e que deve ser evitado [4].

Em alternativa, as microalgas marinhas surgem como fontes adequadas de lípidos para a produção de biodiesel e bio-jetfuel [5], uma vez que podem ser cultivadas em terrenos não aráveis ou superfícies oceânicas, com recurso a água do mar ou água salobra em vez de água de regadio. De resto, existem fortes evidências que a produtividade das microalgas é significativamente superior à de qualquer planta terrestre [6]. Porém, os BOM ainda não conseguem competir com os combustíveis fósseis em termos de preço. As microalgas que são cultivadas atualmente em larga escala são espécies de crescimento relativamente lento como, por exemplo, *Dunaliella salina*, ou foram selecionadas devido ao seu perfil favorável de ácidos gordos polinsaturados n-3 (mais conhecidos por “ómega 3”), algo essencial para o seu uso como alimen-

to em aquacultura e nutrição humana. Porém, o que é bom para a saúde, não é necessariamente bom para a produção de biocombustíveis. Elevados níveis de insaturação tornam o biodiesel resultante desses lípidos instável em termos oxidativos, havendo a necessidade deles serem hidrogenados, o que aumenta os custos de produção.

CTP4 é uma estirpe candidata à produção de BOM no Algarve

De acordo com recentes estudos técnico-económicos [7], a estratégia usada pelo CCMAR tem-se centrado na pesquisa de novas estirpes de microalgas mais adequadas para a produção de BOM através de métodos de rastreio de alto rendimento [5]. Utilizando a técnica de sorteamento de células ativada por fluorescência com fluorocromos solvatocrómicos lipossolúveis (BODIPY 505/515 e Vermelho do Nilo), foi possível isolar várias estirpes axénicas de microalgas ricas em lípidos em questão de semanas a partir de amostras de águas costeiras do Algarve com graus de eutrofização variável. Tal resultou no isolamento de uma estirpe de alga verde (CTP4) de rápido crescimento, altamente resistente a vários tipos de stress abiótico, incluindo temperaturas baixas (5°C) e elevadas (35°C), concentrações extremas de nutrientes e salinidades. Esta estirpe, quando sob stress nutricional, induz um elevado número de glóbulos lipídicos que fluorescem na presença do fluorocromo BODIPY (Fig. 1), podendo acumular lípidos, com um perfil de baixa insaturação, até 40% do seu peso seco. A utilização de técnicas de melhoramento genético poderão aumentar ainda mais este valor e aumentar a produtividade desta estirpe.

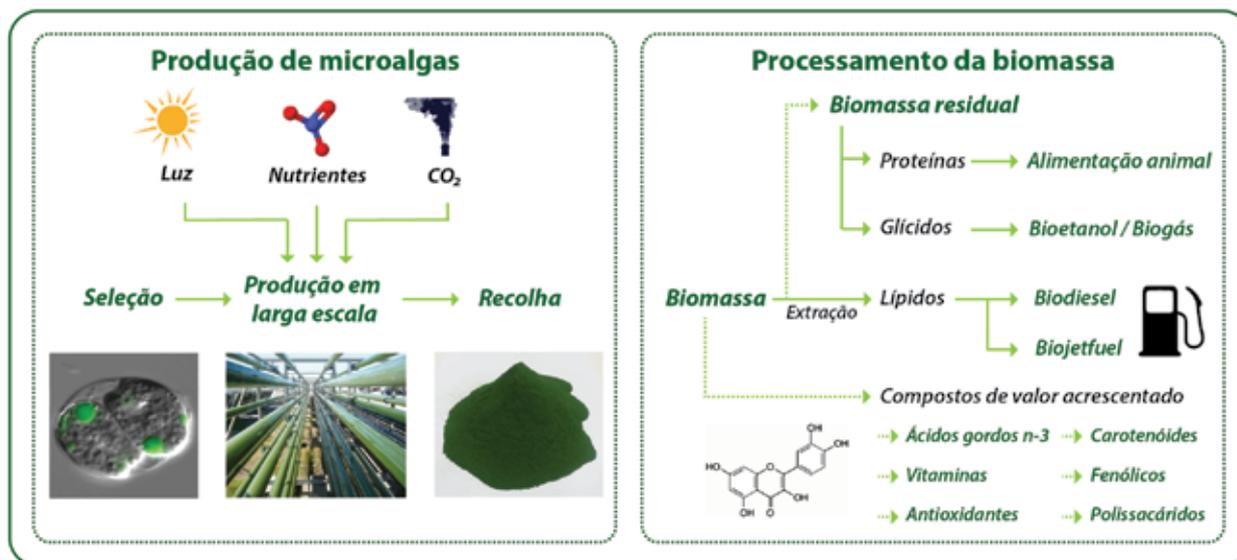


Figura 2 – Diagrama simplificado de uma biorrefinaria para o integral aproveitamento de biomassa algal para a produção de biodiesel / biojetfuel. Após a extração dos compostos de valor acrescentado, que serviriam para aumentar o valor comercial da biomassa, seguir-se-ia o processamento dos lípidos a biocombustíveis líquidos. A biomassa residual, no entanto, poderia ainda ser utilizada para a produção de biogás / bioetanol por digestão anaeróbia / fermentação dos glicídios. Por último, as proteínas poderiam ser utilizadas pela indústria alimentar. A fotografia de fotobiorreactor tubular foi gentilmente cedida pela Necton, S.A.

No entanto, para uma estirpe ser adequada para a produção de BOM, não basta produzir grandes quantidades lípidos com perfil adequado. Um dos custos mais elevados na produção de biocombustíveis de microalgas corresponde à sua recolha do meio de cultura. Uma vez que a estirpe CTP4 tem um tamanho acima da média (20 μm) e normalmente perde os flagelos quando sob stress, ela sedimenta naturalmente sem haver necessidade da adição de floculantes. Tal característica é essencial para reduzir os custos de recolha da biomassa algal ao diminuir o volume de cultura que necessita de ser processado. Deste modo, esta estirpe apresenta-se como uma forte candidata à produção de BOM no Algarve. Além disso, como é uma estirpe autóctone, encontra-se já adaptada às condições ambientais locais, uma vantagem que não deve ser subestimada.

Conclusão

Apesar destas perspectivas favoráveis ao desenvolvimento de BOM em Portugal, existem vários fatores que se têm de conjugar para que estes sejam competitivos com os combustíveis fósseis, sendo o preço um fator essencial. Para tal é necessário a implementação do conceito de biorrefinaria (Fig. 2) em que a biomassa algal é integralmente utilizada, desde os lípidos e glicídios para a produção de BOM (biodiesel, biojetfuel e biogás), proteínas para rações e vários compostos bioativos com aplicação biomédica e/ou nutracêutica. Assim, poder-se-á baixar o preço final dos biocombustíveis, já que as restantes utilizações permitirão custear a produção e processamento da biomassa, através da cogeração de electricidade e venda de produtos de maior valor acrescentado como, por exemplo, carotenóides, vitaminas, e biomassa algal com elevado teor antioxidante para produtos cosméticos e alimentares [8-10].

Agradecimentos

Os trabalhos de investigação aqui descritos foram torna-

dos possíveis pelos projetos SEABIOMED (PTDC/MAR/103957/2008) e XTREMEBIO (PTDC /MAR-EST/4346/2012) financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e o Orçamento de Estado.

Referências

- [1] Marinha Portuguesa (2014). *Portugal, uma nação marítima*. Folheto da Marinha Portuguesa, Portugal (disponível em: http://www.marinha.pt/pt-pt/historia-estrategia/estrategia/foihetospt/Portugal_uma_nacao_maritima.pdf [acedido a 7 de maio de 2014]).
- [2] EMEPC (2014). *Extensão da Plataforma Continental Portuguesa: no território, na ciência e na tecnologia*. Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental, Portugal (disponível em: <http://www.emepc.pt/images/stories/site2013/docsdivulgacao/fichapepc.pdf> [acedido a 7 de maio de 2014]).
- [3] Guzella L, Sciarretta A (2007) *Vehicle propulsion systems – Introduction to modelling and optimization*, 2ª ed., Springer, Berlin.
- [4] Graham-Rowe, D. (2011) Agriculture: beyond food versus fuel. *Nature* 474, pp. S6-S8.
- [5] Pereira H, Barreira L, Mozes A, Florindo C, Polo C, Duarte CV, Custódio L, Varela J (2011) Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae. *Biotechnol. Biofuels* 4: 61.
- [6] Georgianna DR, Mayfield SP (2012) Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature* 488: 329-335.
- [7] Davis R, Aden A, Pienkos PT (2011) Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Applied Energy* 88: 3524-3531.
- [8] Pereira H (2009) *Desenvolvimento e optimização de um meio de cultura para a produção de biomassa algal em larga escala*. Tese de Mestrado, Necton S.A. e Universidade do Algarve, Portugal.
- [9] Custódio L, Justo T, Silvestre L, Barradas A, Vizetto-Duarte C, Pereira H, Barreira L, Rauter AP, Albericio F, Varela J (2012) Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry* 131: 134-140.
- [10] Custódio L, Soares F, Pereira H, Barreira L, Vizetto-Duarte C, Rodrigues MJ, Rauter AP, Albericio F, Varela J (2014) Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology* 26: 151 - 161.



Produtos naturais: a riqueza incalculável dos micro-organismos marinhos

Pedro N. Leão¹, Vitor Vasconcelos^{1,2}

¹Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR/CIMAR), Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal

²Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal

E-mail: pleao@ciimar.up.pt

Resumo

Embora historicamente os produtos naturais sejam a fonte principal de fármacos aprovados para o tratamento de humanos, o enfoque de investigação e desenvolvimento da indústria farmacêutica tem-se afastado deste grupo de compostos. No entanto, o crescente número de moléculas que têm vindo a ser descobertas no meio marinho – na sua maioria produzidas por micro-organismos – e a chegada ao mercado de alguns destes compostos, evidenciam o potencial dos oceanos e do seu microbiota como fonte de diversidade química com impacto na saúde humana. O vasto território marinho de Portugal alberga assim oportunidades de igual dimensão no que toca à descoberta de novas moléculas.

Uma breve perspectiva histórica

É do conhecimento geral que os microrganismos são uma fonte de moléculas com utilidade clínica. Este conceito está presente na cultura popular quanto mais não seja pela histórica e atribulada descoberta da penicilina. É, no entanto, mais comum associar-se tal propriedade às plantas, para as quais existe extenso conhecimento etnofarmacológico a nível global. O século passado, principalmente até à década de 70, foi rico em campanhas de bioprospecção em ambientes terrestres, perpetradas por grandes companhias farmacêuticas e que resultaram na descoberta de um grande número de novas moléculas, muitas das quais chegaram posteriormente ao mercado como fármacos. Newman e Cragg [1] estimam que cerca de 50% de Novas Entidades Químicas aprovadas para uso em humanos nos EUA são ou produtos naturais ou seus derivados, e assim têm sido ao longo de pelo menos três décadas. Destes, uma larga maioria terá a sua origem biossintética em micro-organismos [1]. Não obstante, o desenvolvimento de metodologias sintéticas de química combinatorial, que permitem criar um número elevadíssimo de diferentes moléculas – mais adequadas a estratégias de High-Throughput Screening – impulsionaram uma mudança de paradigma na indústria farmacêutica [2,3]. Talvez paradoxalmente, a pouco e pouco, as suas caras operações de bioprospecção foram descontinuadas e os seus laboratórios de química dos produtos naturais, onde eram realizados laboriosos processos de extração, fraccionamento e purificação de novas moléculas foram fechados ou adaptados, de tal forma que no início do milénio eram quase inexistentes [4].

Entretanto, no final dos anos 60, um grupo de cientistas pioneiros começa a focar-se na bioprospecção marinha e a encontrar moléculas com estruturas interessantes e elevadas bioactividades nos mais diversos organismos que habitam os oceanos, algumas das quais chegaram já aos mercados [5].

Como uma das principais limitações na descoberta de novos produtos naturais é a disponibilidade de material biológico, as investigações iniciais centraram-se em organismos macroscópicos, muitas vezes colhidos às centenas ou mesmo aos milhares, como esponjas, nudibrânquios, fungos e macroalgas [6]. Gradualmente, foi-se substanciando a percepção de que a maioria das moléculas encontradas nos invertebrados teria origem microbiana, o que muito se deveu à similaridade entre estas estruturas e aquelas que já se conheciam de microrganismos terrestres ou se foram entretanto descobrindo nos seus congéneres marinhos [6].

Diversidade biológica e química nos oceanos

Sabemos hoje que os oceanos albergam uma diversidade biológica enorme, em particular microbiana, como foi evidenciado pelas campanhas oceanográficas lideradas por Craig Venter [7]. Podemos dizer com algum grau de certeza que os oceanos são a última fronteira da biodiversidade no nosso planeta, no que concerne tanto a macro como a micro-organismos.

Uma área efervescente da investigação em farmacognosia actual centra-se assim na descoberta de novos compostos de origem microbiana marinha [6]. Grandes esforços neste sentido têm sido envidados pela comunidade científica e semanalmente são reportados novos produtos naturais marinhos. Todavia, nem todos os micro-organismos marinhos têm capacidades biossintéticas notáveis – na verdade, há três grupos que se sabe actualmente serem particularmente prolíficos na produção de metabolitos secundários: os filos *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* e a ordem *Myxococcales* pertencente ao filo *Proteobacteria* [8], embora este último grupo não tenha sido estudado extensivamente no meio marinho. Importa enfatizar que se conhece actualmente uma ínfima parte da diversidade prevista para estes e outros micro-

organismos [9]. Entende-se assim a pertinência de catalogar, estudar e eventualmente capturar este potencial genético e – claro está – químico, que está por descobrir. Mantém-se, pelo menos nos próximos anos, a questão da fonte de material biológico. A estratégia mais utilizada para ultrapassar esta limitação passa pelo isolamento e cultivo em laboratório dos microrganismos. Sabemos, no entanto, que apenas uma pequena fracção destes microrganismos quimicamente férteis é presentemente cultivável em laboratório. Assim, têm sido utilizadas, cada vez com mais frequência, abordagens que não dependem nem do isolamento nem do cultivo dos microrganismos, para se obter conhecimento sobre os seus metabolitos secundários [10]. Estratégias recentes, baseadas na sequenciação de DNA ambiental, anotação dos genes biossintéticos e sua posterior expressão heteróloga têm tido algum sucesso [8].

Descoberta de novos fármacos

A área de investigação em produtos naturais está a viver como que uma renascença, estimulada em grande parte pelas novas moléculas que têm vindo a ser descobertas em ambientes marinhos. Alguns autores consideram já que os produtos naturais se estão a tornar mais atrativos para a indústria farmacêutica (ex: [5]). Estes compostos são o resultado da evolução biológica, no sentido de obter vantagens competitivas, sejam elas a capacidade de obter um determinado recurso, de influenciar um outro organismo ou de eliminar os competidores. São estruturas muitas vezes extremamente complexas, com um elevado número de centros quirais que lhes confere uma forte tridimensionalidade. Por outro lado, os compostos das grandes bibliotecas das companhias farmacêuticas são mais planos, menos complexos, e com tendência a respeitar as famosas regras de Lipinski, as quais não se devem aplicar aos produtos naturais [1]. Assim, é importante entender que estes últimos ocupam um espaço químico vasto e no qual muitas vezes não se encontram compostos inteiramente sintéticos. Concomitantemente, as estruturas dos produtos naturais, altamente afinadas para executarem

o seu papel ecológico, muitas vezes necessitam de algumas alterações para terem a atividade farmacológica ideal [9].

Um perspectiva recente [6] demonstra o sucesso da investigação em produtos naturais marinhos no campo da descoberta de novos fármacos através de um simples indicador – a fracção de compostos de origem marinha que chegam ao mercado regulado, inferior àquela correspondente a compostos de puramente sintéticos (Fig. 1A). Relativamente a estes produtos naturais marinhos que já se encontram no mercado e a outros tantos que estão em ensaios clínicos, o mesmo estudo revela ainda que 85% destas moléculas são efectivamente de origem microbiana (Fig. 1B).

Oportunidades para Portugal

A vasta extensão da costa Portuguesa (que inclui biomas bastante diversificados tanto no continente como nas ilhas), assim, como os sedimentos na nossa ZEE, encontram-se essencialmente por amostrar no que toca à procura de microrganismos produtores de metabolitos secundários. Na verdade, a maioria dos grupos que trabalham em produtos naturais marinhos em Portugal, têm-se focado em invertebrados e fungos macroscópicos. A própria Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental, que tem feito esforços notáveis no sentido de inventariar a biodiversidade marinha para valorizar os nossos recursos naturais, terá, na nossa opinião, dado pouca atenção a este recurso microbiológico, certamente menos visível, mas potencialmente mais rico. Por outro lado, e salvaguardando as meritórias exceções, a pesquisa em biossíntese de metabolitos secundários é residual em Portugal, contrastando com grandes universidades mundiais, que, por seu lado, têm dado atenção a este tópico nos seus *curricula* de ensino e investigação. Tal facto dever-se-á possivelmente a ser uma área de interface entre a química e a biologia que foge da bioquímica clássica, mas também certamente a uma falta de tradição académica nesta área em Portugal.

No CIIMAR, temos vindo a estudar as cianobactérias da nos-

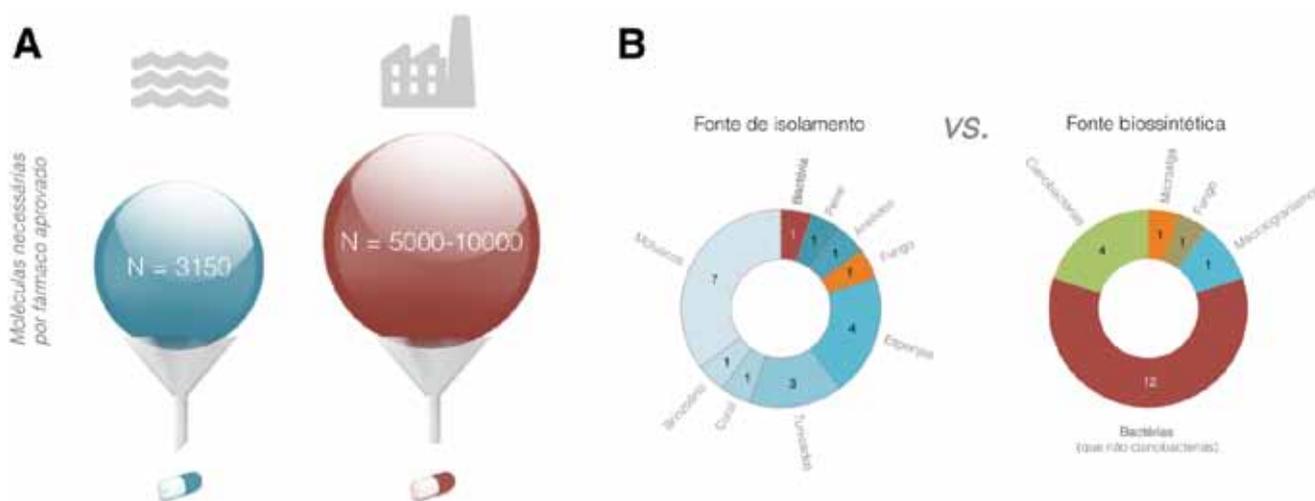


Figura 1 – (A) - Rátios de moléculas de origem marinha e de origem puramente sintética que chegam ao mercado regulado e (B) fonte de isolamento e fonte biossintética das moléculas de origem marinha que se encontram em ensaios clínicos ou já no mercado (adaptado de [6]).

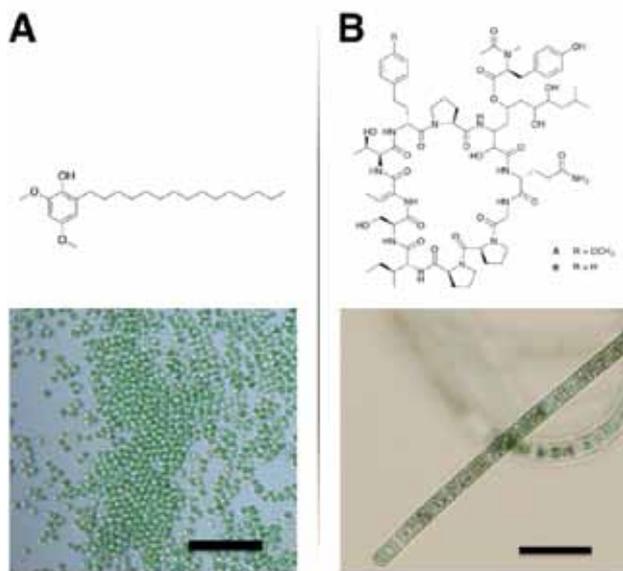


Figura 2 – Moléculas bioativas obtidas a partir de cianobactérias isoladas em Portugal: (A) – hierridina B, produzida pela cianobactéria *Cyanobium* sp. LEGE 06113 e (B) portoamidas A e B, produzidas pela cianobactéria *Oscillatoria* sp. LEGE 05292. Barra de escala = 30 µm.

sa costa numa perspectiva de diversidade biológica e do potencial químico que está associado a essa diversidade. Verificámos que muitas das estirpes que isolámos da nossa costa têm actividade biológica (ex: [11]), incluindo estirpes que, por terem genomas mais pequenos, não têm merecido tanta atenção no que toca ao seu metabolismo secundário. Na verdade, de uma destas estirpes (*Cyanobium* sp. LEGE 06113) isolámos compostos antimaláricos, como por exemplo a hierridina B (Figura 2A) [12]. Isolámos e caracterizámos ainda compostos com actividade anticancerígena – portoamidas A e B (Fig 2B) – a partir de uma cianobactéria filamentosa isolada em Portugal [13] (cultivada em água doce mas similar a muitas outras cianobactérias marinhas). Na verdade, estamos ainda a iniciar esforços mais alargados de selecção de estirpes e isolamento de compostos bioactivos, mas os nossos resultados preliminares indicam que temos bastantes moléculas novas para a ciência em processo de isolamento e actividades biológicas interessantes quer em linhas cancerígenas, como em ensaios antibacterianos e também em ensaios em que utilizamos organismos marinhos como alvo.

A área de estudo dos produtos naturais marinhos – que hoje

é claramente multidisciplinar, utilizando conceitos e técnicas da genética, microbiologia, química orgânica e bioquímica – está numa fase de desenvolvimento embrionário no nosso país. No entanto, do enorme potencial de diversidade biológica que advém da nossa geografia, resulta um conjunto de oportunidades para cientistas e empreendedores que desejem navegar esta onda da biotecnologia azul.

Referências

- [1] Newman DJ, Cragg GM (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75: 311-335.
- [2] Koehn FE, Carter GT (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 206-220.
- [3] Li JWH, Vederas JC (2009) Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325: 161-165.
- [4] Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V (2007) The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Products Report* 24: 1225-1244.
- [5] Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP (2009) Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 69-85.
- [6] Gerwick WH, Moore BS (2012) Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chemistry Biology* 19: 85-98.
- [7] Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, et al. (2007) The *Sorcerer II* global ocean sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biology* 5: e77.
- [8] Wilson MC, Mori T, Ruckert C, Uria AR, Helf MJ, et al. (2014) An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* 506: 58-62.
- [9] Achtman M, Wagner M (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology* 6: 431-440.
- [10] Walsh CT, Fischbach MA (2010) Natural Products Version 2.0: connecting genes to molecules. *Journal of the American Chemical Society* 132: 2469-2493.
- [11] Leão PN, Ramos V, Goncalves PB, Viana F, Lage OM, et al. (2013) Chemoecological screening reveals high bioactivity in diverse culturable Portuguese marine cyanobacteria. *Marine Drugs* 11: 1316-1335.
- [12] Leão PN, Costa M, Ramos V, Pereira AR, Fernandes VC, et al. (2013) Antitumor activity of Hierridin B, a cyanobacterial secondary metabolite found in both filamentous and unicellular marine strains. *PLoS ONE* 8: e69562.
- [13] Leão PN, Pereira AR, Liu W-T, Ng J, Pevzner PA, et al. (2010) Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 11183-11188.

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Visite o nosso site
www.spbt.pt

Potencial biotecnológico do mar dos Açores

Maria do Carmo Barreto^{1,2}, Ana Seca^{2,3}, Ana Costa⁴, Ana Neto¹, Nelson Simões¹

¹CIRN, ²DCTD e ⁴CIBIO-Açores, Universidade dos Açores, 9501-801 Ponta Delgada

³QOPNA, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro

E-mail: barreto@uac.pt

Introdução

O ambiente marinho constitui uma extraordinária reserva de compostos com características estruturais únicas, diferentes das encontradas nos Produtos Naturais de origem terrestre [1]. Os compostos de origem marinha assumem assim um papel cada vez mais significativo na descoberta de novos medicamentos, de novas aplicações em cosmética, na produção de enzimas com características específicas [2] ou como biomateriais para engenharia de tecidos [3]. A investigação nesta área, no âmbito do Crescimento Azul, ganhou novo impulso com a Estratégia Nacional para o Mar e as diretivas do Horizonte 2020. A elevada biodiversidade do mar dos Açores e os ambientes e ecossistemas que o distinguem de outras regiões, nomeadamente a influência do vulcanismo ativo e residual, estão na base da investigação que tem vindo a ser feita na Universidade dos Açores, pelo Grupo de Biotecnologia do Centro de Investigação em Recursos Naturais (CIRN), em colaboração com o DCTD, DB e CIBIO-Açores.

Compostos de interesse biotecnológico identificados em algas e invertebrados

No âmbito de projetos financiados pela FCT e pelo FRC/ Governo Regional dos Açores, o Grupo de Biotecnologia do CIRN tem vindo a estudar o potencial farmacológico de algas e invertebrados. Foram já descobertos, na alga *Cystoseira abies-marina*, quatro compostos com estruturas até agora nunca encontradas na Natureza (Fig. 1).

Três destes compostos têm grande atividade anticancerígena *in vitro*, em particular o cystoazorol A [4]. Dado o elevado interesse destes compostos como agentes quimioterápicos, a caracterização do seu mecanismo de ação está atualmente a ser investigada. Estão ainda a ser estudadas outras frações de extratos desta espécie, e ainda outras algas da costa dos Açores consideradas promissoras em estudos preliminares de rastreio [5].

Para além das pesquisas realizadas com organismos nativos, tem vindo a tornar-se relevante a ideia de explorar o potencial económico de algumas espécies exóticas. Pretende-se assim avaliar o potencial de algumas espécies marinhas exóticas e/ou invasoras, para permitir o desenvolvimento de possíveis aplicações destas e conseqüentemente diminuir o seu impacto negativo na biodiversidade dos mares dos Açores (projeto ASMAS). Neste sentido, está-se a estudar o potencial farmacológico e biotecnológico de algumas destas espécies, focando a investigação em três vertentes principais: (i) atividade antitumoral, (ii) atividade anticolinesterásica e (iii) atividade anti-incrustante (antifouling). A pesquisa de tecnologias anti-incrustantes não tóxicas e de baixo custo assume uma particular relevância, uma vez que a incrustação de invertebrados e algas nos cascos de embarcações leva a perdas económicas avultadas, devido ao aumento do consumo de combustível resultante do atrito [6].

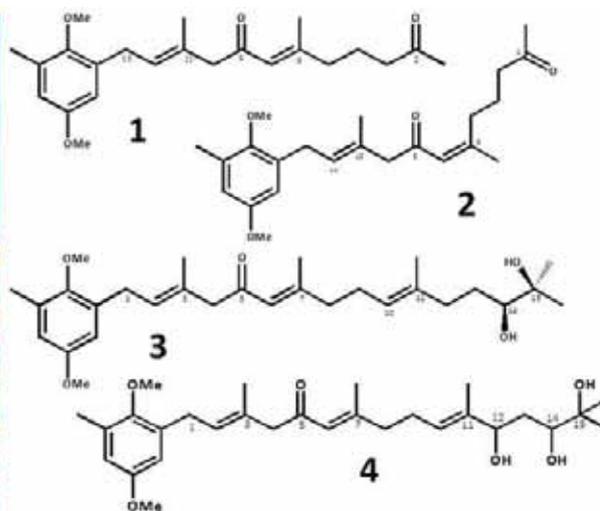
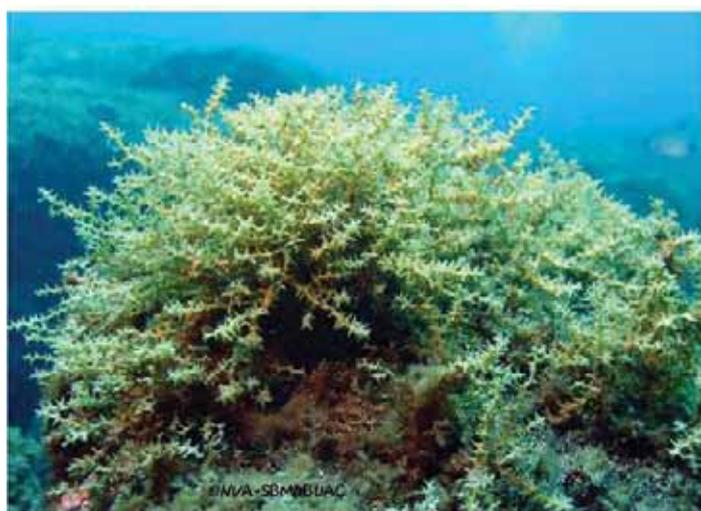


Figura 1 – *Cystoseira abies-marina* e compostos novos: 1, cystoazorona A, 2, cystoazorona B, 3, cystoazorol A e 4, cystoazorol B. Foto: Nuno Vaz Álvaro

Identificação de bactérias de fontes termais de baixa profundidade com potencial biotecnológico

Outra linha de investigação que está a ser desenvolvida centra-se na pesquisa de produtos em bactérias termofílicas marinhas de fontes hidrotermais de baixa profundidade. Foi já constituída uma Coleção de Bactérias Termofílicas Marinhas recolhidas nestas fontes termais junto à costa da ilha de S. Miguel. A pesquisa de bioatividades nestas bactérias permitiu até ao momento identificar isolados que apresentam elevada atividade enzimática (Fig. 2), a partir de uma das quais se purificou e isolou uma amilase com elevada estabilidade térmica, que poderá ter aplicações na indústria.

O rastreio de 86 isolados permitiu ainda identificar isolados com elevada actividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e mesmo contra MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, um dos maiores problemas em infeções hospitalares). Neste momento está em curso a purificação e caracterização das moléculas com atividade antibacteriana.

O potencial dos organismos de fontes termais de mar profundo

As fontes hidrotermais marinhas de mar profundo possuem condições extremas de pH, temperatura, pressão e concentração de diversos metais. Os organismos que evoluíram nestes ambientes desenvolveram estratégias de sobrevivência que incluem a síntese de biomoléculas com propriedades extraordinárias, tais como proteínas que resistem a ambientes comparáveis aos existentes em muitos processos industriais [7]. No mar dos Açores têm vindo a ser estudadas as potencialidades biotecnológicas de invertebrados e procariontes recolhidos nestes ecossistemas.

Destaque-se como exemplo o estudo do transcriptoma das guelras de *Bathymodiolus azoricus*, um mexilhão de profundidade recolhido na fonte hidrotermal Lucky Strike, que permitiu identificar um microbioma metabolicamente ativo e uma enorme variedade de mecanismos e vias metabólicas [8]. Mais recentemente, na fonte hidrotermal Menez-Gwen foram isoladas bactérias com elevada atividade fotoprotetora, o que é de grande interesse uma vez que existe uma enorme procura de protetores solares de origem natural e com bandas de absorção intensas e alargadas [9]. Estes autores estabeleceram métodos de extração sustentáveis e de elevado rendimento e constituíram uma biblioteca de 484 extratos orgânicos e aquosos, 22% dos quais apresentavam uma capacidade fotoprotetora de interesse industrial.

Conclusões

Os resultados obtidos até ao presente mostram o potencial e provam o interesse de continuar a investigação na área da Biotecnologia Azul, com o objetivo de descobrir novas substâncias com elevado valor acrescentado no mar dos Açores. A valorização económica dos recursos marinhos deverá também contribuir para preservar a Biodiversidade marinha,

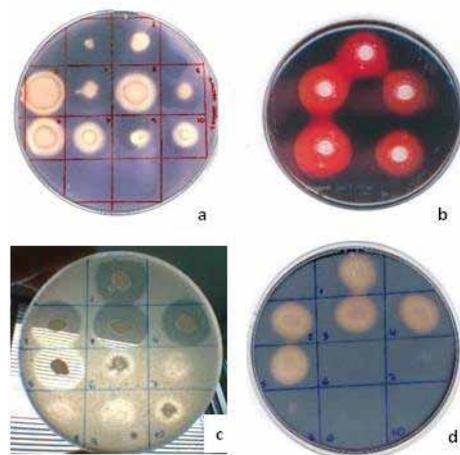


Figura 2 – Atividade amilásica (a, d), celulásica (b), proteásica (c), e quitinolítica de bactérias isoladas de fontes marinhas de baixa profundidade.

alertando para a importância do “reservatório” de futuros medicamentos e de outros compostos de grande utilidade.

Agradecimentos

FCT (projecto PTDC/MAR/100482/2008 e financiamento do QOPNA / Universidade de Aveiro). FRC - Governo Regional dos Açores (Projectos M3.1.1/I/013/2005/A, M1.1.1/I/005/2005, M316/F/063/2009 e M.2.1.2/I/025/2008-RTF/1 e ASMAS-M2.1.2/F/032/2011 e financiamento do CIRN / Universidade dos Açores).

Referências

- [1] Querellou J, Børresen, T Boyen, C Dobson, A Höfle, M lanora, A Jaspars, M Kijjoo, A Olafsen, J Rigos, G Wijffels R (2010) Marine Biotechnology: a new vision and strategy for Europe: Marine Board-ESF Position Paper 15. Beernem, Belgium: European Science Foundation. (Marine Board-ESF Position Paper; No. 15).
- [2] Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Murray HGM, Prinsep MR (2014) Marine natural products. *Natural Products Reports* 31: 160-258.
- [3] Senni K, Pereira J, Gueniche F, Delbarre-Ladrat C, Siquin C, Ratiskol J, Godeau G, Fischer A-M, Helley D, Collic-Jouault S (2011) Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Marine Drugs* 9: 1664-1681
- [4] Gouveia V, Seca AML, Barreto MC, Neto A, Kijjoo A, Silva AMS (2013) Cytotoxic meroterpenoids from the macroalgae *Cystoseira abies-marina*. *Phytochemistry Letters*, 6: 593-597
- [5] Barreto MC, Mendonça E, Gouveia V, Anjos C, Medeiros JS, Seca AML, Neto AI (2012) Macroalgae from S. Miguel Island as a potential source of antiproliferative and antioxidant products. *Arquipelago. Life and Marine Sciences* 29: 53-58.
- [6] Schultz MP (2007) Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. *Biofouling* 23:331-341.
- [7] Champdoré M, Staiano M, Rossi M, Sabato D'Auria S (2007) Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *Journal of the Royal Society Interface* 4: 183-191
- [8] Egas C, Pinheiro M, Gomes P, Barroso C, Bettencourt R (2012) The Transcriptome of *Bathymodiolus azoricus* Gill Reveals Expression of Genes from Endosymbionts and Free-Living Deep-Sea Bacteria. *Marine Drugs* 10: 1765-1783
- [9] Martins A, Tenreiro T, Andrade G, Gadanho M, Chaves S, Abrantes M, Calado P, Tenreiro R, Vieira H (2013) Photoprotective bioactivity present in a unique marine bacteria collection from Portuguese deep sea hydrothermal vents. *Marine Drugs* 11: 1506-1523.

Cultivo de macroalgas nos Açores...

Oportunidades e desafios

Rita F. Patarra^{1,4}, Alejandro H. Buschmann², Maria H. Abreu³, Ana I. Neto^{1,4}

¹Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN), Departamento Biologia, Universidade dos Açores, 9501-801 Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

²Centro de Investigación y Desarrollo en Recursos y Ambientes Costeros (I-MAR), Universidad de Los Lagos, Camino a Chiquihue Km 6, Casilla 557 Puerto Montt. X Región, Chile

³ALGAplus, Produção e Comercialização de Algas e Seus Derivados, Lda., Travessa Alexandre da Conceição, 3830-196 Ílhavo, Portugal

⁴Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), Laboratório de Investigação Aquática Macaronésica (MAR), Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal

E-mail: rpatarra@uac.pt

Resumo

As macroalgas marinhas têm uma grande diversidade de aplicações. Nos Açores, várias espécies têm sido usadas tradicionalmente para alimentação humana e para extração de agar, um ficolóide aplicado na indústria alimentar e farmacêutica. As exigências no controlo da qualidade das matérias-primas e as práticas atuais de colheita de macroalgas marinhas selvagens na Europa exigem uma gestão eficaz deste recurso natural e, simultaneamente, tornam premente a necessidade de se implementarem métodos de produção de biomassa controlados, nomeadamente, práticas de cultivo. Apesar da importância reconhecida da exploração sustentável dos recursos marinhos existentes nos Açores, não existe qualquer informação sobre a viabilidade do cultivo de macroalgas marinhas no Arquipélago. O objetivo principal do presente projeto é avaliar o potencial de cultivo de espécies de macroalgas marinhas selecionadas, bem como identificar as melhores práticas de recolha desse recurso natural.

Palavras-chave: Algas marinhas, aquacultura, avaliação *stocks*.

Abstract

Seaweeds have a wide range of applications. In the Azores, several species of seaweeds were traditionally used either as food or for extraction of chemical products, namely agar used in the food and pharmaceutical sectors. Requirements on product quality control and concerns regarding the environmental sustainability of current wild seaweed biomass harvesting practices in Europe demand for controlled seaweed aquaculture as well as good management practices of the wild resource. Despite the interest in exploiting Azorean marine resources, there is no information on the feasibility of cultivating seaweed in the Azores. The present project aims at evaluating the cultivation potential of selected Azorean species and to investigate the best harvesting practices of that natural resource.

Key words: marine algae, aquaculture, stocks evaluation.

Enquadramento

O uso de algas na alimentação humana é conhecido desde o século IV no Japão e desde o século VI na China. Contudo, apenas a partir dos anos 1930s foram comercializados os primeiros extratos de algas castanhas, contendo alginatos, vendidos como agentes espessantes e gelificantes [1]. Atualmente, as algas são usadas como fertilizantes na agricultura e horticultura, suplementos alimentares para animais, rações para aquacultura, consumo humano, na indústria farmacêutica e da cosmética [2].

É de salientar que o cultivo de algas é bastante superior à sua recolha na natureza, a qual representou apenas 4,5 % do total da produção em 2010. Segundo a FAO, no relatório de 2012 sobre "O estado mundial da pesca e da aquacultura" [3], até à data, apenas as macroalgas foram registadas nas

estatísticas de produção de plantas aquáticas a nível mundial. O volume de produção de macroalgas aumentou em taxas anuais médias de 9,5 % em 1990 e 7,4 % na década de 2000 (comparável com as taxas de crescimento na produção de animais aquáticos de aquacultura), equivalentes a produções de 3,8 milhões de toneladas em 1990 e de 19 milhões de toneladas em 2010. Contudo, apenas 5 espécies contabilizam 98,9% dessa produção (Figura 1) que, contrastando com a produção piscícola, é realizada num reduzido número de países. A FAO refere que para o ano de 2010, a produção de algas foi registada em apenas 31 países e territórios, sendo 99,6 % da produção mundial de algas originária de apenas 8 países: China (58,4 %; 11,1 milhões de toneladas), Indonésia (20,6 %; 3,9 milhões de toneladas), Filipinas (9,5 %; 1,8 milhões de toneladas), Coreia do Sul (4,7 %; 901 700 toneladas), Coreia do Norte (2,3 %, 444 300 toneladas), Japão (2,3 %, 432 800 toneladas), Malásia (1,1 %,

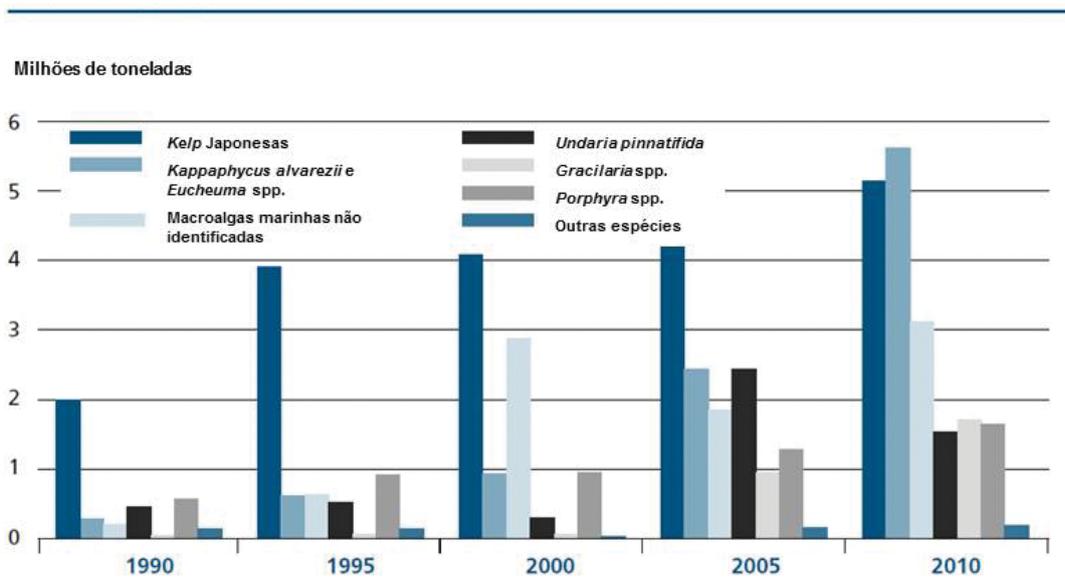


Figura 1 – Produção mundial de plantas aquáticas (algas) por espécie e ou grupos de espécies (adaptado de FAO 2012).

207 900 toneladas) e a República Unida da Tanzânia (0,7 %, 132 000 toneladas) [3]. Nos países ocidentais, apesar da sua produção não ter uma grande representação percentual nas estatísticas mundiais (máximo 1%), a comercialização e o consumo de macroalgas tem aumentado nos últimos anos, como por exemplo nos Estados Unidos da América, Austrália, Chile, Reino Unido, Irlanda, Islândia, Canadá e França, existindo atualmente 22 espécies de algas regulamentadas para consumo alimentar na Europa [4].

Os padrões de qualidade exigidos e as preocupações quanto à sustentabilidade ambiental das práticas de colheita de macroalgas marinhas selvagens nestes países têm motivado o interesse na implementação do cultivo de macroalgas.

O caso dos Açores

No Arquipélago dos Açores as macroalgas marinhas têm sido tradicionalmente usadas na alimentação humana. A alga castanha *Fucus spiralis* (Figura 2a), de nome comum “tremoço do mar”, é consumida como um petisco; a alga vermelha *Porphyra* (Figura 2b), de nome comum “erva patinha”, é consumida frita e usada na confeção de sopas, omeletes ou tortas; as algas vermelhas *Laurencia* (Figura 2c) e *Osmundea* (Figura 2d), de nome comum “erva malagueta”, são conservadas em vinagre e consumidas ao longo de todo o ano em algumas ilhas [5]. Apesar do seu valor nutricional, até há poucos anos não existiam, a nível regional, estudos científicos que corroborassem a noção empírica do seu valor nutricional. Na última década foram realizados diversos trabalhos [e.g. 6-11] no Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN) da Universidade do Açores sobre a bioquímica das espécies consumidas localmente, bem como de outras espécies com possível interesse económico. As algas vermelhas *Pterocladia capillacea* (Figura 2e) e *Gelidium microdon* (Figura 2f) foram comercializadas no arquipélago até ao início da década de 1990. Eram recolhidas manualmente ou por mergulho, posteriormente secas ao ar (era comum obser-

var-se longos tapetes de algas a secar ao longo dos passeios em Vila Franca do Campo, Ilha de São Miguel, e em outras localidades) e preparadas para exportação, sendo depois utilizadas na produção industrial de agar [5]. Num trabalho realizado nos anos 1980 foram estudados vários aspetos sobre a apanha e a biologia da alga agarófito *P. capillacea*. Os dados da época mostravam que nos Açores estavam a ser recolhidas 1800 toneladas (peso seco), o que representava 325 toneladas de agar de grande qualidade [12].

Com a atual tendência para o consumo de alimentos cultivados organicamente, provenientes de ambientes naturais não poluídos, as algas marinhas estão a receber uma crescente aceitação por parte do consumidor. De forma a valorizar os recursos regionais, está em curso no CIRN um projeto em colaboração com a Universidade de Edimburgo, Inglaterra, e com a Escola de Formação Turística e Hoteleira de Ponta Delgada que testa o potencial de espécies selecionadas de macroalgas na confeção de pratos *gourmet*. Sendo os Açores ilhas vulcânicas com reduzida extensão de litoral rochoso, é importante avaliar formas alternativas de produção de macroalgas que possam satisfazer futuras demandas. É no sentido de colmatar esta lacuna que decorre o projeto de doutoramento “Oportunidades para o desenvolvimento da aquacultura nos Açores”, o qual tem como objetivos principais investigar o potencial de cultivo de macroalgas comuns no arquipélago dos Açores e avaliar a exploração sustentável dos *stocks* naturais. Os resultados do programa de doutoramento serão de extrema importância quer em termos científicos quer em termos empresariais. Fornecerão conhecimentos sobre os requisitos básicos para o cultivo em grande escala das espécies nativas selecionadas que permitirão aumentar a produção da respetiva biomassa através de cultivo. Permitirão a transferência de tecnologia para o tecido empresarial regional e para a implementação de empresas de base tecnológica indo ao encontro das futuras políticas de financiamento europeias no âmbito do Programa Europeu Horizonte 2020.

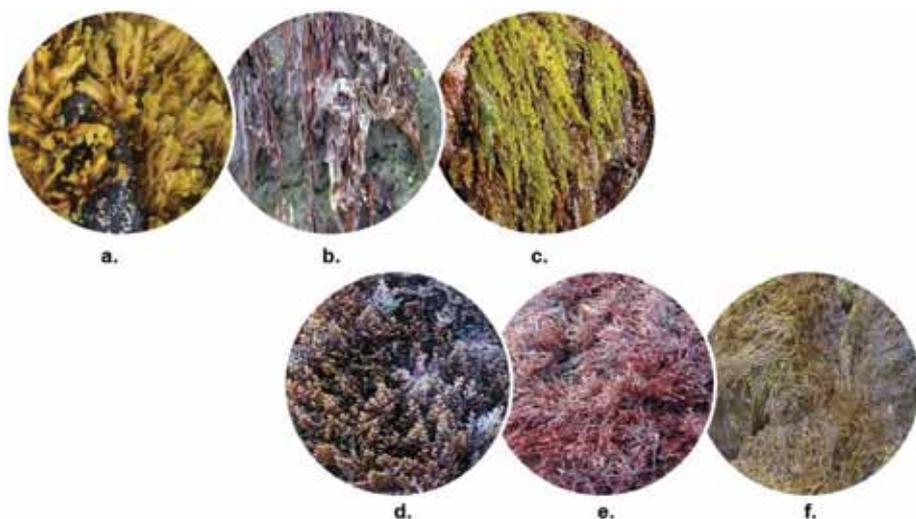


Figura 2 – Macroalgas marinhas tradicionalmente usadas na alimentação e para comercialização, em algumas ilhas do Arquipélago dos Açores. **a.** *Fucus spiralis*; **b.** *Porphyra* sp; **c.** *Laurencia viridis*; **d.** *Osmundea pinnatifida*; **e.** *Pterocladia capillacea* e **f.** *Gelidium microdon*). Fotos **a, d, f:** © Eunice Nogueira©. Fotos **b, c, e:** Pedro Raposeiro.

Agradecimentos

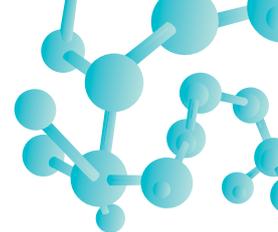
Agradece-se aos autores, Mestre Eunice Nogueira e Doutor Pedro Raposeiro, pela disponibilização das fotografias usadas na Fig. 2. O projeto de doutoramento de Patarra RF é financiado pelo Fundo Regional de Ciência, Açores, Portugal (M3.1.2/F/024/2011). Agradece-se à empresa ALGaplus, Produção e Comercialização de Algas e Seus Derivados, Lda., pela formação em técnicas de cultivo de macroalgas ainda a decorrer nas suas instalações.

Referências

- [1] Mchugh DJ (2003) A Guide to the Seaweed Industry. FAO Fisheries Technical Paper 441. Available from: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm>
- [2] Ferreiro UV (2011) CETMAR, 162pp. ISBN: 978-84-615-4974-0.
- [3] FAO (2012) The state of the world fisheries and aquaculture 2012. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, 209pp. ISBN: 978-92-5-107225-7.
- [4] Abreu MH, Pereira R, Sassi J-F (in press) Marine Algae and the Global Food Industry. In Marine Algae - Biodiversity, Taxonomy, Environmental. SCIENCE PUBLISHERS - CRC Press / Taylor & Francis Group.
- [5] Neto AI, Tittley I, Raposeiro PM (2005) Flora Marinha do Litoral dos Açores. Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Ponta Delgada, Açores, Portugal, 156pp. ISBN: 97299884-0-4
- [6] Paiva L, Lima E, Patarra RF, Neto AI, Baptista J (2014) Edible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health. *Food Chemistry* (in press).
- [7] Gouveia V, Seca AML, Barreto MC, Neto AI, Kijjoo S, Silva MAS (2013) Cytotoxic meroterpenoids from the macroalga *Cystoseira abies-marina*. *Phytochemistry Letters* 6(4): 593-597.
- [8] Patarra RF, Leite J, Pereira R, Baptista J, Neto AI (2013) Fatty acid composition of selected macrophytes. *Natural Product Research* 27(7): 665-669.
- [9] Barreto MC, Mendonça E, Gouveia V, Anjos C, Medeiros JS, Seca AML, Neto AI (2012) Macroalgae from S. Miguel Island as a potential source of antiproliferative and antioxidant products. *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 29: 53-58.
- [10] Paiva LS, Patarra RF, Neto AI, Lima EMC, Baptista JAB (2012) Antioxidant activity of macroalgae from the Azores. *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 29: 1-6.
- [11] Patarra RF, Paiva L, Neto AI, Lima E, Baptista J (2011) Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology* 23 (2): 205-208.
- [12] Fralick RA, Andrade F (1981) The growth, reproduction, harvesting and management of *Pterocladia pinnata* (Rhodophyceae) in the Azores, Portugal. In: Proc. Xth Int. Seaw. Symp., Göteborg, Sweden. (Levring, T. Eds), pp. 289-296. Berlin: Walter de Gruyter.

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Visite o nosso site
www.spbt.pt



As macroalgas marinhas dos Açores e o seu valor nutricional

Lisete Paiva^{1,3,4,5}, Elisabete Lima^{1,2,3}, Ana Isabel Neto^{3,4,5}, José Baptista^{1,2,3}

¹Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento (DCTD), Universidade dos Açores, 9501-801 Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

²Centro de Investigação em Tecnologias Agrárias dos Açores (CITA-A), Universidade dos Açores, 9700-071 Angra do Heroísmo, Terceira, Açores, Portugal

³Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN), Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, 9501-801 Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

⁴Grupo Biologia Marinha, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, 9501-801 Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

⁵Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR/CIMAR), Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal

E-mail: lisetepaiva@uac.pt

Introdução

A grande diversidade de organismos marinhos e o seu potencial biotecnológico têm despertado a atenção e o interesse de cientistas das diversas áreas da biotecnologia. Como é do conhecimento geral, os produtos naturais são fontes potencialmente importantes para a descoberta de novos compostos nutricionalmente benéficos e farmacologicamente ativos. A descoberta de novas substâncias naturais e biologicamente ativas tem vindo a ser uma das apostas das indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar, com o principal objetivo comum da descoberta de novas substâncias menos tóxicas e mais benéficas para a saúde humana, bem como da procura de novos alimentos funcionais. Além disto, existe um crescente interesse da ciência dos alimentos, pelos chamados grupos de alimentos funcionais, entre os quais estão as algas marinhas, que têm merecido especial reconhecimento por serem um grupo de alimentos capaz de proporcionar benefícios fisiológicos e nutricionais adicionais [1], em virtude da sua diversa e equilibrada composição química.

As algas são organismos autotróficos e fotossintetizantes que pertencem a uma multiplicidade de nichos ecológicos e estão sujeitas às mais variadas condições ambientais, por vezes extremas. Esta situação tem como consequência a biossíntese de metabolitos secundários, sendo alguns deles compostos ativos com propriedades benéficas para a saúde, pelo que a sua utilização como ingredientes funcionais abre novas possibilidades no processamento de alimentos [2].

As macroalgas podem ser classificadas como algas vermelhas (*Rhodophyta*), castanhas (*Heterokontophyta*, *Phaeophyceae*) ou verdes (*Chlorophyta*), dependendo da sua composição química e consequentemente nutricional. No seu ambiente natural, as macroalgas estão expostas a variações sazonais de fatores ambientais como a temperatura das águas, salinidade, luz e nutrientes disponíveis, que influenciam o seu metabolismo (fotossíntese e crescimento) e, consequentemente, a biossíntese dos seus constituintes químicos [3].

Desde a antiguidade que as algas fazem parte da dieta tradicional das comunidades costeiras, sendo o seu consumo mais expressivo na Ásia Oriental, especialmente no Japão, China e Coreia. Muitos estudos têm mostrado que as macroalgas contêm quantidades significativas de proteínas [4], vitaminas e minerais essenciais para a nutrição humana, assim como contêm uma proporção elevada de ácidos gordos mono- e poli-insaturados essenciais, particularmente os de cadeia longa das séries ómega 3 e ómega 6 [5] e, ainda, compostos antioxidantes [6]. Devido ao seu particularmente elevado teor em proteínas, as algas tornaram-se importantes componentes para a indústria alimentar, especialmente nos países desenvolvidos [7].

O consumo de algas nos Açores

Em algumas ilhas dos Açores, as algas são tradicionalmente utilizadas para consumo humano ou para fins comerciais. As algas vermelhas *Laurencia* e *Osmundea*, mais conhecidas como “erva malagueta”, são conservadas em vinagre e consumidas a acompanhar peixe frito. As algas *Pterocladia capillacea* e *Gelidium microdon* são utilizadas na produção industrial de agar. A alga castanha *Fucus spiralis* (figura 1. A), conhecida como “tremoço do mar”, é uma iguaria local, e é considerada um petisco, sendo as porções reprodutivas terminais do seu talo consumidas frescas. *Porphyra* (figura 1. B), conhecida como “erva patinha”, é consumida frita ou incorporada em sopas, tortas e omeletes [8].

Investigação em curso sobre o potencial nutricional de algas do litoral açoriano

Com a finalidade de comprovar a mais-valia nutricional das macroalgas marinhas, tradicionalmente consumidas por populações de algumas ilhas do Arquipélago dos Açores, está em curso uma investigação aplicada a algumas dessas espécies. Os resultados obtidos até ao momento revelam que *Porphyra* sp., *Osmundea pinnatifida*, *Gelidium microdon* e



Figura 1 – Macroalgas marinhas dos Açores. A) *Fucus spiralis*; B) *Porphyra* sp.

Pterocladia capillacea (Rhodophyta), possuem um elevado conteúdo em proteínas, comparativamente com algas Chlorophyta e Heterokontophyta (*Phaeophyceae*) que apresentam teores de proteína relativamente mais baixos.

As macroalgas são também uma excelente fonte de fibras totais (figura 2), nomeadamente *Fucus spiralis*, seguindo-se *Gelidium microdon*, *Cystoseira abies-marina* e *Ulva rigida*. É do conhecimento comum que alimentos ricos em fibras e, particularmente as algas, facilitam o trânsito intestinal, baixam o colesterol no sangue e reduzem doenças como o cancro do cólon [9].

Quanto aos ácidos gordos, as macroalgas possuem, geralmente, níveis baixos de ácidos gordos saturados, e são uma importante fonte de alguns ácidos gordos essenciais, nomeadamente do ácido alfa-linolénico (ALA). Por exemplo, as macroalgas *Chaetomorpha pachynema* e *Porphyra* sp. possuem um teor elevado de ácido eicosapentanoico e de ALA, respetivamente [5].

As macroalgas apresentam uma relação terapêuticamente promissora em ácidos gordos hipocolesterolémicos e hipercolesterolémicos revelando elevados benefícios para a saúde, nomeadamente o efeito cardio-protetor. Quanto à composição em ácidos gordos das séries ómega 3 e 6 (n-3 e n-6, respetivamente), as algas possuem uma relação n-6/n-3 baixa revelando uma predominância dos ácidos gordos n-3 sobre os n-6 e consequentemente um efeito protetor das doenças cardiovasculares. Segundo Honya *et al.* [10], as algas apresentam, no entanto, uma distribuição diferente ao longo do seu crescimento pelo que a época de recolha das algas deve ser escolhida com cuidado.

No que concerne às vitaminas, as macroalgas possuem vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis e algumas apresentam um elevado teor em vitamina E, nomeadamente a espécie *Fucus spiralis*. Esta alga apresentou também uma elevada atividade antioxidante ($60.05 \pm 4.29\%$) [6], sendo, portanto, uma excelente fonte daquele antioxidante natural, que desempenha uma função importante na saúde, inibindo a oxidação do LDL, assim como reduz a formação de prostaglandinas pro-inflamatórias e do tromboxano.

Em relação aos minerais, as macroalgas apresentam um teor elevado de macrominerais, nomeadamente de magnésio (*Ulva rigida* e *Ulva compressa*), cálcio (*Osmundea pinnatifida*) e potássio (*Cystoseira humilis*, *Porphyra* sp. e *Pterocladia capillacea*), e uma baixa razão Na/K em todas as espécies estudadas até ao momento, com potenciais efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente, para quem sofre de hipertensão. O conteúdo em minerais nas algas marinhas é elevado comparativamente aos valores apresentados para os vegetais terrestres mais comuns [11], pois as algas têm a capacidade de acumular minerais de acordo com as condições ambientais onde estão inseridas.

Conclusão

Com a atual tendência dos consumidores para adotarem o consumo de alimentos organicamente naturais e provenientes de ambientes limpos, as algas têm vindo a receber uma maior aceitação por parte do público. Neste contexto, o consumo de algas seria uma excelente opção, particularmente no Arquipélago dos Açores que está rodeado por águas não poluídas e com excelentes condições ambientais, de acordo com os parâmetros da Diretiva Quadro da Água [12].

O consumo regular de macroalgas permite aumentar a ingestão de proteínas, fibras, vitaminas, aminoácidos essenciais e ácidos gordos poli-insaturados, que previnem a ocorrência de algumas doenças crónicas (diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, cancros, entre outras), as quais estão particularmente associadas com dietas pobres em fibras, caso dos países ocidentais [13] onde se tem verificado uma redução progressiva do consumo de produtos alimentares frescos.

Muitos estudos têm sido realizados em algas, tendo por objetivo a sua caracterização bioquímica, assim como, o isolamento de compostos com diversas atividades biológicas, que poderão ser utilizados como possíveis agentes nutracêuticos, apresentando um elevado potencial para exploração pela biotecnologia.

A informação sobre a composição nutricional das macroalgas edíveis dos Açores comprova o elevado valor biológico



Figura 2 – A) Extrator de fibras; B) Processo de digestão das fibras.

deste produto regional, com consequente impacto na saúde pública se integrado como alimento regular na dieta da população.

Referências

- [1] Madhusudan C, Manoj S, Rhaul K, Rishi C (2011) Seaweeds: A Diet with nutritional, medicinal and industrial value. *Research Journal of Medicinal Plant* 5: 153-7.
- [2] Fleurence J (1999) Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science and Technology* 10 (1): 25–28.
- [3] Orduña-Rojas J, Robledo D, Dawes CJ (2002) Studies on the Tropical Agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, *Gracilariales*) from Yucatán, Mexico. I. Seasonal Physiological and Biochemical Responses. *Botanica Marina* 45: 453-458.
- [4] Patarra RF, Paiva L, Neto AI, Lima E, Baptista J. 2011. Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 23(2), 205-208.
- [5] Patarra RF, Leite J, Pereira R, Baptista J, Neto AI (2013) Fatty acid composition of selected macrophytes. *Natural Product Research* 27 (7): 665–669.
- [6] Paiva LS, Patarra RF, Neto AI, Lima EMC, Baptista JAB. 2012. Antioxidant activity of macroalgae from the Azores. *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 29: 1-6.
- [7] Wong KH, Cheung PCK (2000) Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds part I—proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. *Food Chemistry* 71: 475–482.
- [8] Neto AI, Tittley I, Raposeiro PM (2005) *Flora Marinha do Litoral dos Açores*. Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, p 157.
- [9] Guidel-Urbano M, Goni I (2002) Effect of edible seaweeds (*Undaria pinnatifida* and *Porphyra tenera*) on the metabolic activities of intestinal microflora in rats. *Nutrition Research* 22: 323–331.
- [10] Honya M, Kinoshita T, Ishikawa M, Mori H, Nisizawa K (1994) Seasonal variation in the lipid content of cultured *Laminaria japonica*: fatty acids, sterols, 3-carotene and tocopherol. *Journal of Applied Phycology* 6: 25-29.
- [11] Ortega-Calvo JJ, Mazuelos C, Hermosin B, Saiz-Jimenez C (1993) Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. *Journal of Applied Phycology* 5: 425-435.
- [12] Neto AI, Brotas V, Azevedo JMN, Patarra RF, Álvaro NV, Gameiro C, Prestes AC, Xavier ERN (2009) *Qualidade de águas costeiras do Grupo Oriental do arquipélago dos Açores e proposta de monitorização*. Universidade dos Açores, Ponta Delgada, Açores, Portugal. 70p.
- [13] Southgate DAT (1990) Dietary fiber and health. pp.10-19. In DAT Southgate, K Waldron, IT Johnsons, and GR Fenwick. *Dietary Fiber: Chemical and Biological Aspects*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.

Macro e microalgas como fonte natural de pigmentos

M.M. Sampaio, Alexandra Cruz

Grupo de Investigação em Recursos Marinhos, ESTM-Instituto Politécnico de Leiria, Campus 4, 2520-641 Peniche, Portugal

E-mail: aarlacruz@ipleiria.pt

Resumo

O crescente reconhecimento de novos compostos com interesse biotecnológico provenientes de algas marinhas tem conduzido a uma maior atenção para estes organismos, bem como para o seu cultivo. Por outro lado, nos últimos anos tem-se intensificado a controvérsia em torno dos aditivos alimentares sintéticos, sendo cada vez maior a procura pela indústria alimentar de alternativas naturais implicitamente biodegradáveis e também seguras, por não serem tóxicas nem cancerígenas. Os corantes naturais têm sido alvo de particular interesse pois muitos destes pigmentos apresentam características adicionais que os valorizam, nomeadamente as propriedades nutricionais e atividade biológica benéfica dado o seu potencial antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório, anti-obesidade e neuroprotetor. O isolamento e investigação de pigmentos a partir de macro e microalgas é uma área de desenvolvimento oportuna e rentável.

Pigmentos em macroalgas

As macroalgas são reconhecidas fontes de substâncias bioativas como polissacáridos, proteínas, lípidos e polifenóis, com propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas, entre outras. Há variações sazonais e ambientais na composição das macroalgas e na consequente produção destes compostos [1]. São inúmeros os trabalhos que reportam a bioatividade de compostos extraídos de macroalgas. Holdt e Kraan resumiram estes dados relativamente a famílias de macroalgas de interesse comercial do noroeste europeu, entre estes compostos surgem os pigmentos [1].

Pigmentos são compostos químicos que absorvem radiação na zona do visível. A estrutura da molécula do cromóforo é a base para uma das suas classificações (cromóforos com sistemas conjugados como os carotenóides e as antocianinas, e porfirinas metalo-coordenadas como a clorofila) [1]. As macroalgas são classificadas de acordo com o seu teor em pigmentos, nomeadamente em Phaeophyceae (algas castanhas), Rhodophyceae (algas vermelhas) e Chlorophyceae (algas verdes). No entanto, a presença de pigmentos nas algas não despertou durante muito tempo particular interesse, ao contrário do que aconteceu nas plantas. É recente a exploração do potencial destes organismos relativamente ao seu elevado teor em pigmentos fotossintéticos com atividade biológica reconhecida, por exemplo como antioxidantes (fucoxantina, ficoeritrobilina, clorofila a e seus derivados) ou anti-inflamatórios (fucoxantina e feofitina a) [2].

Clorofilas, carotenóides e ficobilinas são as classes de pigmentos presentes em macroalgas com diferentes aplicações. O teor de pigmentos (violaxantina, fucoxantina, β -caroteno e clorofila a) em *Ascophyllum* tem máximo em maio e decréscimo entre julho e novembro, uma variação sazonal distinta da observada em *Fucus serratus*. Também o stress ambiental

afecta estes compostos, com uma maior produção em zonas portuárias comparativamente com locais de mar aberto [1].

As clorofilas são pigmentos lipossolúveis verdes que contêm o anel porfirina e são encontrados em todas as algas, plantas superiores e cianobactérias. Quatro tipos de clorofila estão presentes nas macroalgas, clorofila a, b, c, e d (esta apenas nas algas vermelhas) [2]. A clorofila é convertida em feofitina e derivados em vegetais processados e após ingestão. Estes derivados demonstraram efeito antimutagénico e podem ter ação na prevenção do cancro [1].

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis de coloração amarela, laranja ou vermelha, mais difundidos na natureza, estando presentes em todas as algas, plantas superiores, fungos e em muitas bactérias fotossintéticas, com uma produção anual na natureza estimada em 10^8 ton/ano [3]. Cerca de 10% desta produção é atribuída à fucoxantina que tem principalmente origem marinha [2]. Os carotenóides (tetraterpenos) são divididos em dois grupos: carotenos (hidrocarbonetos insaturados) e xantofilas (grupos funcionais oxigenados) [2]. As algas verdes incluem β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, as vermelhas contêm principalmente α e β -caroteno, luteína e zeaxantina, enquanto as algas castanhas apresentam β -caroteno, violaxantina e fucoxantina [1]. Todos estes compostos demonstram bioatividade de interesse. Os principais carotenóides com interesse comercial são a astaxantina, o β -caroteno, a cantaxantina e a luteína [4]. Alguns carotenóides também funcionam como vitaminas, por exemplo o β -caroteno extraído de *Porphyra* sp. e de *Palmaria* sp. apresenta actividade provitamina A, com variação sazonal de produção [1]. Também o conteúdo de fucoxantina em macroalgas é sazonal e dependente da espécie e do seu ciclo de vida. Este pigmento castanho é apontado como um constituinte alimentar natural para a prevenção da obesidade e controle de peso, para além de

apresentar atividade antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, neuro e osteoprotetora [1, 2].

Outros pigmentos encontrados em macroalgas são as ficobilinas, proteínas solúveis fluorescentes. As ficobilinas são pigmentos solúveis em água, de coloração azul ou vermelha, presentes nas divisões Rhodophyta, Cyanobacteria e Cryptophyta. Geralmente mascaram a presença da clorofila, proporcionando colorações azuladas ou avermelhadas às algas. As três principais categorias de ficobiliproteínas são: i) ficoeritrina, de coloração vermelha; ii) ficocianina, de coloração azul; e iii) aloficocianina, de coloração azul [2]. A ficoeritrina é a mais abundante ficobillina nas algas vermelhas. São utilizadas como corantes naturais em aplicações alimentares e cosméticas [1] e também como marcadores fluorescentes, aplicadas em ensaios imunológicos, microscópicos e de ligação ao ADN [5], mas simultaneamente apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuro e hepatoprotetora, antiviral, anti-tumoral, entre outras [1].

Pigmentos em microalgas

As microalgas marinhas são um dos grupos mais diversificados de organismos oceânicos, representando um recurso pouco explorado de substâncias naturais com utilidades nas áreas alimentar, da saúde e da biotecnologia. O conteúdo proteico das macroalgas é substancialmente menor do que o das microalgas, que apresentam uma elevada amplitude em termos de qualidade nutricional [6]. As microalgas apresentam um elevado potencial de aplicações e têm sido fonte de diversos compostos para a nutrição humana e para a aquicultura, para uso como biofertilizantes e em tratamento de efluentes, para uso como anti-inflamatórios, anti-alérgicos e analgésicos [5], pois entre os produtos extraídos e comercializados encontram-se ácidos gordos polinsaturados, proteínas, polissacarídeos, corantes naturais, entre outros [7]. No entanto, a produção de corantes, nomeadamente carotenóides, tem-se revelado ser o principal mercado para a biotecnologia de microalgas, pois podem conter mais de 15% em carotenóides [8]. E esta procura prevê-se que venha ainda a aumentar, uma vez que o mercado tem intensificado o interesse em corantes provenientes de fontes biológicas [4].

As produções em massa de astaxantina, de β -caroteno e de luteína são feitas com recurso a diferentes espécies de microalgas, nomeadamente *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Murielopsis* sp. e *Scenedesmus almeriensis*; estes organismos podem chegar a acumular cerca de 10% do seu peso seco em corante [9]. Embora as produções tenham melhorado substancialmente, pensa-se que poderão ainda aumentar com a aplicação de condições de stress (limitação de azoto, elevada salinidade, elevada intensidade luminosa, baixas temperaturas) [8]. Vários trabalhos têm sido realizados com vista à otimização de vários parâmetros que condicionam o crescimento de microalgas e produção de astaxantina, em particular com *Haematococcus pluvialis*. Estes resultados,

conciliados com os avanços na tecnologia de fotobioreatores permitiram a produção comercial de astaxantina a partir de microalgas, atingindo valores correspondentes a 3% do peso seco [10]. No entanto, a extensão das condições de stress a aplicar às microalgas é ainda desconhecida, tendo já sido observadas grandes diferenças na concentração de carotenóides devido a ligeiras alterações ambientais [8], o que sugere que muita investigação futura deve ser centrada no controlo do metabolismo da síntese de carotenóides em microalgas.

Conclusão

Os pigmentos provenientes de algas representam uma alternativa aos pigmentos sintéticos comercializados, dado serem uma fonte de compostos bioativos e poderem ser aplicados em produtos alimentares funcionais e inovadores, assim como na prevenção e tratamento de algumas doenças crónicas. A questão da sustentabilidade dos ecossistemas marinhos é fundamental, sendo necessário a aposta no cultivo de espécies de algas com maior potencial e, sempre que possível, otimizando a rentabilidade com o desenvolvimento de processos de extração de pigmentos compatíveis com a obtenção de outros produtos de interesse comercial.

Bibliografia

- [1] Holdt SL, Kraan S (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23:543-597.
- [2] Pangestuti R, Kim SK (2011) Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods* 3:255-266.
- [3] Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O (2000) Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(3): 173-289.
- [4] Del Campo JA, Barcia-González M, Guerrero MG (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 1163-74.
- [5] Raposo MFJ, Morais RMSC, Morais AMB (2013) Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences* 93: 479-486.
- [6] Samarakoon K, Jeon YJ (2012) Bio-functionalities of proteins derived from marine algae – A review. *Food Research International* 48: 948-960.
- [7] Chen C-Y, Yeh K-L, Aisyah R, Lee D-J, Chang J-S (2010) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology* 102: 71-81.
- [8] Wijffels RH (2008) Potential sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology* 26: 26–31.
- [9] Fernández-Sevilla JM, Fernández FGA, Grima EM (2010) Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96: 27-40.
- [10] Higuera-Ciajara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46: 185-196.

Cianobactérias como fontes de compostos naturais de interesse biotecnológico

Vitor Vasconcelos^{1,2}

¹Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR/CIMAR), Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal

²Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal

E-mail: vmvascon@fc.up.pt

Cianobactérias e seus metabolitos secundários

As cianobactérias são organismos procarióticos fotossintéticos, que, em condições ambientais favoráveis (luz, temperatura, estabilidade física e abundância de N e P), se podem desenvolver em grandes densidades – florescências (Fig. 1). Estas florescências podem ter impactos muito negativos nos ecossistemas, podendo causar a morte de organismos aquáticos e terrestres. A origem ancestral das cianobactérias permitiu-lhe desenvolver um complexo conjunto de metabolitos secundários, muitos dos quais com atividade biológica interessante do ponto de vista da sua utilização para diversos fins. Muitos destes compostos, de natureza peptídica, são produzidos por via ribossomal, mas outros não, sendo suportados por agrupamentos génicos complexos e que, para a mesma substância, podem variar de espécie para espécie.

A investigação sobre os metabolitos secundários das cianobactérias não é recente, datando já desde há dois séculos atrás, quando Francis em 1878, na Austrália, investigou a morte de carneiros que beberam água do lago Alexandrina [1]. Descobriu que a causa da morte foi a ingestão de água com densas massas de uma cianobactéria *Nodularia spumigena* que mais tarde se veio a descobrir produzir o metabolito tóxico nodularina. Assim, os primeiros metabolitos secundários de cianobactérias que foram mais intensamente estudados foram os que tinham propriedades tóxicas para mamíferos – cianotoxinas. Mais recentemente, outros metabolitos produzidos por cianobactérias têm vindo a ser estudados, descobrindo-se propriedades de fotoproteção [2], anticancerígenas, anti-trombocíticas [3,4] entre outras aplicações na área da saúde. No entanto, muitos destes metabolitos têm também vindo a ser estudados do ponto de vista da sua importância para as cianobactérias, como alelopáticos, inibidores de predação, sinalizadores e auxiliares na competição [5].

Toxinas de cianobactérias

Embora os primeiros registos de produção de cianotoxinas por cianobactérias datem do século XIX, só no século seguinte se começou a elucidar a estrutura destas toxinas e avaliar a sua diversidade. De fato, hoje conhecem-se mais de 150 variantes de cianotoxinas, divididas em grupos quanto

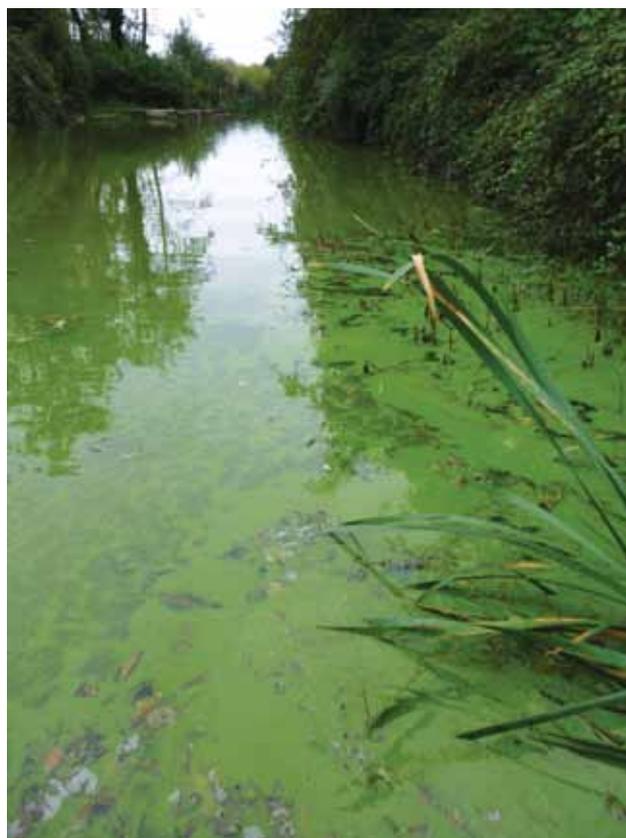


Figura 1 – Florescência de *Microcystis* spp. Nos lagos do parque da Cidade do Porto (Outubro 2013)

às suas características químicas e quanto à sua ação sobre mamíferos (Tabela 1).

As cianotoxinas são produzidas por cianobactérias de água doce, salobra e marinhas e algumas recentemente têm vindo a ser detetadas em simbioses, por exemplo em líquenes [6]. Quimicamente apresentam grande diversidade, sendo de destacar os péptidos cíclicos como as microcistinas e nodularinas, os alcaloides: saxitoxinas, cilindrospermopsina, anatoxina-a e lyngbyatoxina, o aminoácido não proteico BMAA e um organofosforado natural, anatoxina-a(s). Do ponto de vista fisiológico, podem afetar órgãos específicos como o fígado (microcistinas e nodularinas), a transmissão de impulsos nervosos e a estabilidade dos neurónios (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxina, palitoxina, BMAA), podem

Tabela 1 – Quimiodiversidade de cianotoxinas, modo de ação em mamíferos e principais géneros de cianobactérias produtoras. (* estão descritos análogos; N – neurotoxina, H, Hepatotoxina, C- Citotoxina, D- Dermatotoxina).

Cianotoxina	Entidade química	Modo de ação	Cianobactéria
Anatoxina-a*	Alcaloide	N	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Oscillatoria</i>
Anatoxina-a(s)	Organofosforado	N	<i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>A. lemmermani</i>
BMAA	Aminoácido	N	A maioria das espécies
Cilindrospermopsina*	Alcaloide	C	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>Anabaena</i> spp., <i>Raphidiopsis curvata</i> , <i>Umezakia natans</i>
LPS	Lipopolisacarido	D	A maioria das espécies
Lyngbyatoxina*	Alcaloide	N	<i>Moorea producens</i> (antes <i>Lyngbya majuscula</i>)
Microcistina*	Péptido cíclico	H	<i>Microcystis</i> spp.
Nodularina*	Péptido cíclico	H	<i>Nodularia spumigena</i>
Palitoxina*		N	<i>Trichodesmium</i> spp.
Saxitoxina*	Alcaloide	N	Muitas espécies de <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Planktothrix</i>

ser citotóxicas afetando vários órgãos como o fígado e os rins (cilindrospermopsina), ou ser dermatotóxicas (LPS e lyngbyatoxina) e cancerígenas (lyngbyatoxina) (Tabela 1). Muitas destas cianotoxinas possuem variantes, por exemplos as microcistinas têm dois dos seus sete aminoácidos variáveis o que conduziu à descoberta até ao momento de mais de 80 variantes desta molécula, com toxicidade também variável. Desde a década de 1990 que temos vindo a estudar no CIIMAR e na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto a diversidade, métodos de deteção, e efeitos ecológicos das cianotoxinas [7-10]. Também se tem vindo a avaliar as vias de entrada em humanos e possibilidade da sua utilização terapêutica em algumas doenças [11].

Potencial farmacológico

O potencial das cianobactérias como origem de fármacos tem vindo a ser explorado cada vez com mais intensidade, utilizando não só ensaios in vitro com linhas celulares tumorais [4], como ensaios do seu potencial na modulação da ação trombocítica [3] sendo os resultados muito promissores. Por outro lado abordagens genómicas através de técnicas de *gene mining* têm vindo a detetar a produção de metabolitos como as cianobactinas que têm enorme potencial farmacológico na ação antimicrobiana, anticancerígena ou antiparasítica [12]. A pesquisa de genes envolvidos na produção de cianobactinas a partir de novas espécies de cianobactérias de diferentes ambientes e a sua análise filogenética dá-nos indicação da existência de novas cianobactinas [12]. O isolamento e purificação de novos metabolitos guiada por ensaios de bioatividade disponibilizarão novas substâncias que possam entrar no circuito da descoberta de novos fármacos.

Metabolitos secundários de cianobactérias e outras aplicações

Os metabolitos secundários das cianobactérias podem também ter outras aplicações como fotoprotetores, dado produzirem substâncias como as micosporinas podendo ser aplicados em protetores solares [2]. As substâncias com potencial alelopático, podem ter uma aplicação promissora no controle de florescências de microalgas e de outras cianobactérias com potencial tóxico [5]. Na área alimentar, a produção de pigmentos naturais como a ficocianina, ficoeritrina, astaxantina, ou de polissacarídeos têm vindo a demonstrar grandes potencialidades para uma aplicação biotecnológica lucrativa [13]. Os efeitos de extractos de cianobactérias em larvas de invertebrados marinhos demonstram também a capacidade promissora de desenvolver substâncias anti-incrustantes (Fig. 2) [14].

Comparando com outros organismos marinhos como esponjas e outros invertebrados, as cianobactérias apresentam vantagens de poderem ser facilmente isoladas e colocadas em cultivo, evitando uma recolha excessiva de organismos no seu meio natural, e tornando assim esta atividade sustentável do ponto de vista ecológico. As coleções destes organismos, como a que mantemos no CIIMAR com mais de 400 isolados, serão assim um excelente instrumento de trabalho, para a valorização destes recursos naturais, potenciando colaborações entre equipas de investigação, produzindo mais-valias e possibilidades de criação de emprego.

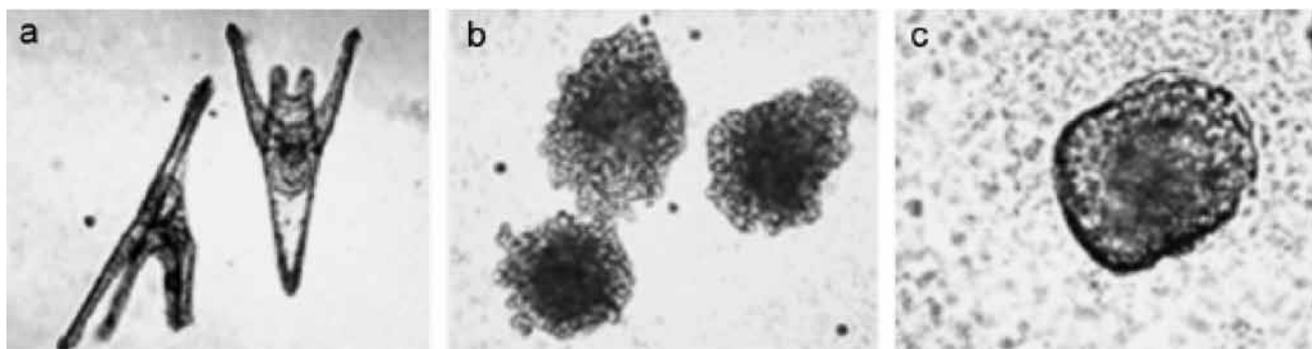


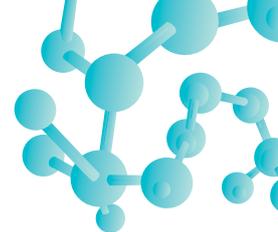
Figura 2 – Efeitos de extratos de cianobactérias marinhas na embriogénese do ouriço do mar *Paracentrotus lividus*. (a) Larva pluteus normal, (b) e (c), anormalidades causadas por exposição a extratos de cianobactérias (modificado de [14])

Agradecimentos

Esta investigação foi financiada pelo European Regional Development Fund (ERDF) através do projeto PharmAtlantic – Atlantic Area Operational Programme (Interreg IVB transnational grant 2009-1/117), através do COMPETE - Operational Competitiveness Programme, por fundos nacionais (FCT) “PEst-C/MAR/LA0015/2013”, pela COST Action ES 1105 “CYANOCOST- Cyanobacterial blooms and toxins in water resources: Occurrence, impacts and management” e pelo projeto MARBIOTECH (NORTE-07-0124-FEDER-000047), co-financiado pelo North Portugal Regional Operational Programme (ON.2 – O Novo Norte), under the National Strategic Reference Framework (NSRF), through the ERDF.

Referências

- [1] Francis G (1878) Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11–12
- [2] Singh SP, Hader DP, Sinha RP (2010) Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Research Reviews* 9: 79–90.
- [3] Selheim F, Herfindal L, Martins R, Vasconcelos VSO (2005) Neuro-apoptogenic and thrombocyte function modulating toxins in non-blooming marine cyanobacteria from the Portuguese coast. *Aquatic Toxicology* 74: 294-306
- [4] Leão P N, Costa M, Ramos V, Pereir, AR, Fernandes VC, Domingues VF, Gerwick WH, Vasconcelos V, Martins R (2013) Antitumor activity of hierridin B, a cyanobacterial secondary metabolite found in both filamentous and unicellular marine strains. *PLoS One* 8/9: e69562
- [5] Leão PN, Niclas E, Antunes A, Gerwick WH, Vasconcelos V (2012) The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Products Reports* 29372-391
- [6] Kaasalainen U, Fewer DP, Jokela J, Wahlsten M, Sivonen K, Rikkinen J (2012) Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109(15): 5886-5891.
- [7] Vasconcelos VM, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M (1996) Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. *Water Research* 30: 2377-2384
- [8] Saker ML, Metcalf JS, Codd GA, Vasconcelos VM (2004) Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicol* 43: 185-194
- [9] Osswald J, Rellán S, Gago A, Vasconcelos VM (2007) Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria - anatoxina-a. *Environmental International* 33:1070-1089
- [10] Baptista MS, Cianca RCC, Almeida CMR, Vasconcelos VM (2011) Determination of the non protein amino acid β -N-methylamino-L-alanine in estuarine cyanobacteria by capillary electrophoresis. *Toxicol* 58: 410-414
- [11] Herfindal L, Jokela J, Myhren L, Permi P, Selheim F, Wahlsten M, Kleppe R, Krakstad C, Vasconcelos V, Sivonen K, Døskeland SO (2010) A novel nostocyclopeptide inhibits microcystin and nodularin induced apoptosis in hepatocytes. *ChemBioChem* 11: 1594-1599
- [12] Martins JO, Leão PN, Ramos V, Vasconcelos V (2013) N-terminal protease gene phylogeny reveals the potential for novel cyanobactin diversity in cyanobacteria. *Marine Drugs* 11: 4902-4916
- [13] Liu X-J, Chen F (2006) Potential uses of cyanobacteria polysaccharides in the food industry. In: *Food Biotechnology, second ed.* (K. Shetty, et al. eds.). Chapter 1.18. CRC Press, 18 pp.
- [14] Martins R, Fernandez N, Beiras R, Vasconcelos VM (2007) Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains to marine invertebrates. *Toxicol* 50:791-799



Biotecnologia de microalgas marinhas: produtos e serviços

Teresa Lopes da Silva, Alberto Reis

LNEG- Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Unidade de Bioenergia
Estrada do Paço do Lumiar, 22-Edifício F-r/c, 1649-038 Lisboa codex, Portugal - Tel: (+351) 210924726

E-mail: teresa.lopessilva@lneg.pt; alberto.reis@lneg.pt

Autor correspondente: Alberto Reis

Introdução

A biotecnologia de microalgas permite manipular as condições das plantas mais produtivas que existem no nosso planeta para a produção sustentada de produtos de alto valor comercial (fitoesteróis, ácidos gordos poli-insaturados, carotenóides, ficobiliproteínas) e/ou para serviços de inquestionável interesse social e ambiental tais como o tratamento de efluentes ou a biosequestração de carbono. Neste artigo será dado destaque ao trabalho de investigação realizado no LNEG (previamente INETI e LNETI) na área das microalgas marinhas nos últimos 20 anos, em especial em modo heterotrófico em fermentadores. A produção de ácidos gordos insaturados da família ómega 3 (EPA e DHA), será desenvolvida com mais pormenor pela sua importância para a saúde humana comprovada pelo seu aumento de mercado, objecto de artigo de revisão (Mendes *et al.*, 2008) para a microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* e o seu produto principal, o ácido docasahexaenóico-DHA.

Produção de ácidos gordos poli-insaturados por via autotrófica

A diatomácea marinha *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin é uma fonte muito interessante do ácido eicosapentaenóico (EPA- 20:5 ω 3), com reconhecido interesse farmacológico. Reis *et al.* (1996) afinaram as melhores condições de produção *indoors* em mangas de polietileno em regime contínuo, tendo estudado o efeito entre taxa de diluição (D), concentração de nitrato e a composição da microalga. Os resultados indicaram que o EPA era um metabolito intermediário, obtendo-se as maiores produtividades de biomassa e lípidos para baixos valores de D. A maior produtividade em EPA (6 mg l⁻¹ d⁻¹) foi obtida no intervalo para D entre 0.32 e 0.50 d⁻¹. Em condições óptimas, 84% e 11% de todo o EPA encontrava-se nas fracções monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e triglicéridos (TG) respectivamente. As razões EPA/AA (20:4 ω 6) e EPA/20:4 ω 3 obtidas para todas as taxas de diluição estudadas estavam entre as mais elevadas alguma vez publicadas, tornando a purificação de EPA mais fácil a partir desta matéria-prima em relação a outras tradicionalmente usadas, nomeadamente o óleo de peixe marinho.

A passagem à escala piloto em condições reais (ar livre) e em reactores *raceway* foi descrita no trabalho de Veloso *et*

al. (1991) que reportou um ensaio de 84 dias de duração. Obteve-se uma produtividade média em biomassa de 4.0 g m⁻² d⁻¹ em base livre de cinzas em regime semicontínuo (dias 0-74) e 2.0 g m⁻² d⁻¹ em modo *batch* (dias 74-84). O EPA foi o ácido gordo predominante com um teor médio de 3.9% em relação ao peso seco para uma produtividade de 0.15 g m⁻² d⁻¹ em regime semicontínuo. O teor em EPA diminuiu até 0.7% em modo *batch*, com um predomínio dos ácidos gordos 16:0 e 16:1 em relação aos ácidos gordos totais. Estudou-se também o efeito da densidade celular sobre a produtividade. Na gama estudada, verificou-se uma proporcionalidade inversa entre densidade e produtividade em biomassa, e directa entre a mesma grandeza e a produtividade em lípidos. Testaram-se vários flocculantes para a colheita de biomassa. Os melhores resultados foram obtidos com hidróxido de cálcio, Ca(OH)₂ para o intervalo de concentrações entre 30 e 100 mg l⁻¹. A adição de quitosana não melhorou a eficiência da flocculação.

Produção de ácidos gordos poli-insaturados por via heterotrófica

Os óleos de peixes marinhos têm sido a fonte tradicional de DHA (22:6 ω 3), mas este composto pode ser produzido com vantagens adicionais por microorganismos marinhos, designadamente pelo facto do cultivo destes últimos não depender dos stocks marinhos, ao contrário dos primeiros, e o produto final (DHA) obtido por via microbiana não apresentar o cheiro desagradável, característico dos peixes marinhos. Muitos destes organismos podem ser cultivados heterotroficamente com substratos orgânicos sem luz, abrindo a perspectiva de se atingirem elevadíssimas concentrações celulares sob condições controladas e, em consequência, de um produto de composição estável e de qualidade. Entre estes destaca-se o dinoflagelado marinho *Cryptocodinium cohnii* (Figura 1) que alia à sua elevada velocidade de crescimento a capacidade invulgar de praticamente não produzir outros ácidos poliinsaturados para além do DHA, o que o torna muito atractivo para a purificação deste produto de alto valor acrescentado para aplicações farmacêuticas e “nutracêuticas” (Mendes *et al.*, 2008).

O xarope de polpa de alfarroba foi usado como fonte de carbono em fermentações para produção de DHA (Mendes *et al.*, 2007). A alfarrobeira é uma árvore muito comum e

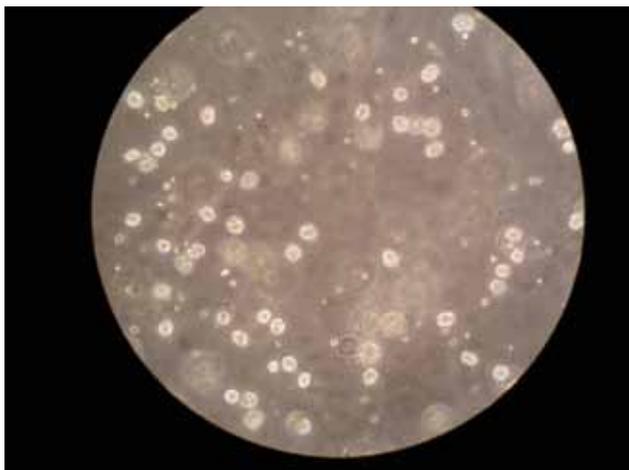


Figura 1 – Células de *Cryptocodinium cohnii* (ampliação: 400x).

abundante nos países da Europa do Sul, e as sementes das suas vagens são utilizadas na indústria alimentar. A polpa, um subproduto desta indústria, pode ser utilizada para produzir um xarope rico em glúcidos (glucose e frutose) que pode ser utilizado em formulações de meios de cultura. No nosso estudo, combinaram-se diferentes diluições de xarope com sal marinho, em formulações simples de meios de cultura. A produtividade em biomassa e a taxa específica de crescimento mais elevadas ($4 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e 0.04 h^{-1} , respectivamente) corresponderam à maior diluição de xarope (1:10.5 (v/v), equivalente a 8.8 g l^{-1} de glucose). O cloreto de amónio e o extracto de levedura foram testados como fontes de azoto tendo-se obtido melhores resultados com a última. Com base no meio de cultura otimizado realizou-se uma produção fermentativa de *C. cohnii* em modo *fed-batch* com uma produtividade de biomassa de $420 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para uma taxa específica de crescimento de 0.05 h^{-1} , e uma concentração final de biomassa de 42.0 g l^{-1} , após 100.4 h de ensaio. Sob as mesmas condições, a concentração de DHA e a taxa volumétrica de produção de DHA atingiram 1.9 g l^{-1} e $18.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente. Desta forma foi apresentado um processo simples e reproduzível de utilização do xarope de polpa de alfarroba como fonte de carbono, transformando um resíduo industrial num produto de elevada cotação e volume de mercado.

A utilização de reactores aeróbios bifásicos em que uma das fases é orgânica e tem maior afinidade pelo oxigénio para melhorar a taxa de arejamento em fermentadores tem sido alvo de estudo pela equipa de investigação do LNEG (Lopes da Silva *et al.*, 2006). Como aplicação real estudou-se a utilização do n-dodecano como vector de oxigénio para o estímulo do crescimento de *Cryptocodinium cohnii* e da produção de DHA (Lopes da Silva *et al.*, 2006a). A fracção volumétrica do vector de oxigénio influenciou positivamente o coeficiente volumétrico de transferência de massa gás-líquido para o oxigénio (k_{La}). Os valores de k_{La} aumentaram de forma praticamente linear com o aumento da percentagem volumétrica de n-dodecano até 1%. A velocidade de agitação teve uma influência superior sobre o k_{La} do que a taxa de arejamento. Correram-se em paralelo, e para as mesmas condições experimentais, dois ensaios de fermenta-

ção em modo *batch*, um sem adição de n-dodecano como controlo (FC) e outro com a adição de 1% (v/v) n-dodecano como vector de oxigénio (FD). Até às 86.7 h de fermentação, a taxa específica de crescimento, a concentração de biomassa, a produção de ácidos gordos e de DHA foram superiores na FC. Porém, o teor mais elevado em DHA na biomassa (6.14%), a maior percentagem de DHA no total de ácidos gordos (51%) e a maior taxa volumétrica de produção de DHA, ($r_{\text{DHA}} 9.75 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foram obtidos no final da fermentação com n-dodecano (FD) (135.2 h). A concentração de oxigénio dissolvido foi sempre superior na fermentação FD do que na FC, indicando uma melhor transferência de oxigénio em presença do vector de oxigénio, tal como esperado.

O ensaio mostrou claramente a existência de comportamentos diferentes com o tempo. No primeiro intervalo (0-86.7 h) a potencial toxicidade introduzida pelo n-dodecano e a adaptação da cultura a esta segunda fase (86.7-135.2 h) foram mais importantes do que o efeito benéfico do arejamento mais eficiente. No último período, o efeito do oxigénio foi mais marcante, em especial quando a densidade celular era mais elevada e o oxigénio poderia limitar a cultura.

Dado que não se observou incremento na percentagem dos restantes ácidos gordos poliinsaturados em *C. cohnii* com o aumento da disponibilidade de oxigénio no caldo fermentativo, excluiu-se a existência de um mecanismo de desaturases dependente do oxigénio, sugerindo-se uma extracção selectiva para o n-dodecano onde os ácidos gordos têm mais afinidade.

De forma a clarificar o potencial efeito tóxico da presença do vector de oxigénio sobre as células de *Cryptocodinium cohnii* cultivadas em modo *batch* em para a produção de DHA, estudou-se a resposta fisiológica do organismo utilizando-se a citometria de fluxo multiparamétrica (Lopes da Silva & Reis, 2008).

Adicionou-se n-dodecano em diferentes concentrações [0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 e 20% (v/v)] em frascos agitados. A fracção em n-dodecano que apresentou melhores resultados em termos de produção de biomassa e DHA foi 0.5% (v/v). As fracções iguais ou superiores a 2.5% (v/v) inibiram o crescimento microalgal e a produção de DHA, apesar de existir sempre uma elevada proporção de células com a membrana citoplasmática intacta no final das fermentações. Após a adição de um pulso de n-dodecano (0.5% v/v) a células de *C. cohnii* em fase exponencial de crescimento em bioreactor, a taxa volumétrica de consumo de glucose aumentou 2.5 vezes, com aumento da taxa volumétrica de produção de biomassa de 2.8 vezes. A taxa específica de crescimento em biomassa aumentou 1.5 vezes. A percentagem de DHA na biomassa, percentagem de DHA nos ácidos gordos e concentração em DHA também aumentaram 54, 22 e 58%, respectivamente, após a mesma adição, sem que a integridade da membrana tenha sido afectada, como foi demonstrado por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a adição de 0.5% de n-dodecano (v/v) a fermentações de *C. cohnii* pode ser um método simples e de baixo custo para o aumento de produção de biomassa e de DHA, sem recorrer a elevadas velocidades de agitação (evitando assim *stress* hidromecânico nas células

da microalga por elevadas tensões de corte e maiores custos de energia).

Na fase de *downstream processing* desenvolveu-se um processo simples e pouco dispendioso para a concentração e purificação de DHA produzido por *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316, envolvendo saponificação e metilação da biomassa húmida (com poupança da etapa de secagem), *winterização* e cristalização de ureia de forma sequencial (Mendes *et al.*, 2007a). Foram testadas diversas razões mássicas ureia/ácidos gordos e temperaturas de cristalização para o método de cristalização final. A análise ANOVA revelou que, para a gama estudada, a temperatura foi o parâmetro que teve o maior efeito sobre a concentração de DHA. A fracção de DHA mais pura (99.2 % do total de ácidos gordos) obteve-se para uma razão ureia/ácidos gordos (m/m) de 3.5, às temperaturas de cristalização de 4 e 8 °C. O rendimento em DHA mais elevado (49.9 %) foi obtido a 24 °C para a razão ureia/ácidos gordos (m/m) de 4.0, correspondente à pureza de 89.4 % DHA do total de ácidos gordos. Considerando as elevadas proporções de DHA obtidas, e o elevado grau de pureza exigido pela indústria farmacêutica, o processo proposto é promissor para uma potencial ampliação de escala pré-comercial nesta área.

Biosequestração de carbono

A utilização de culturas intensivas de microalgas por via autotrófica em fotobiorreactores surge como o único processo biológico de captura de gases de efeito estufa (GEE) de origem antropogénica por via industrial (em especial CO₂) verdadeiramente sustentável e aplicável em grande escala que se conhece.

A empresa chilena Clean Energy ESB SA (<http://www.clean-energy.cl>) tem como missão contribuir para o desenvolvimento de energias limpas, amigas do ambiente, através de novas tecnologias e o desenvolvimento de um conceito de negócio sustentável, focado para a protecção do meio ambiente e o uso responsável dos recursos naturais que contribuam para a mitigação das alterações climáticas.

Desenvolveu-se uma focagem que combina tecnologias para a captura de GEE e produção de biocombustíveis, com vantagens comparativas com outros projectos de energia presentes no sistema, pelos benefícios ambientais e sociais que este projecto incorpora. Este conceito de empresa combina duas opções para a produção de energia:

- Instalações emissoras de GEE, (carvão, diesel, gás, outras)
- Instalações para a produção industrial de microalgas (biocombustíveis e outras substâncias, utilizando o conceito da biorrefinaria).

Este processo de desenvolvimento contou com o acompanhamento da Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile), no melhoramento de variáveis técnicas para o cultivo de microalgas, obtendo resultados promissores para um *scale-up* a nível industrial, tanto na captação de gases, na produção de biocombustíveis, na reutilização de água do processo e com a colaboração do LNEG, através de assistên-



Figura 2 – Instalação piloto para a produção de microalgas em fotobiorreactores alveolares planos a partir de gases emitidos por central térmica em Ventanas, Chile.

cia de consultoria técnico-científica no desenvolvimento e validação destas tecnologias, em especial no *design* do processo e no dimensionamento e projecto de fotobiorreactores, e na concepção da instalação piloto, incluindo laboratório de ensaios. Actualmente está em operação uma instalação piloto (Figura 2) para produção de biocombustíveis a partir do cultivo de microalgas marinhas utilizando gases emitidos pela multinacional AES Gener na termoeléctrica situada em Las Ventanas, Quinta Região do Chile, na costa do Oceano Pacífico, o que permite a extrapolação de dados para uma primeira instalação industrial de 100 ha de cultivos na mesma zona numa primeira fase, e numa segunda fase uma expansão do projecto com uma instalação em Mejillones e Tocopilla, na Segunda Região do Chile (deserto de Atacama), onde se registam os melhores indicadores edafoclimáticos do mundo para a produção comercial de microalgas.

Os resultados são muito promissores até à data, com produtividades volumétricas de microalgas em fotobiorreactores alveolares planos (Figura 2) que ultrapassam 100 g m⁻² d⁻¹ em regime semicontínuo, com uma estirpe marinha de *Chlamydomonas* sp. isolada localmente e já adaptada às condições muito agressivas do seu ambiente de crescimento (crescimento em gases libertados da instalação fabril sem qualquer tipo de diluição- teor médio de 15% v/v em CO₂). De acordo com o coeficiente estequiométrico carbono/biomassa (Y_{CX}) são de prever taxas de remoção de CO₂ superiores a 200 g CO₂ m⁻² d⁻¹. O desenvolvimento de processo deu-se a partir de uma microalga nativa já adaptada às condições de processo e não como consequência de um rastreio a partir de diversas estirpes de algoteca. Com esta opção

houve um avanço de 3 anos no tempo de optimização e com a vantagem adicional de aproveitar a vantagem selectiva de adaptação do local às mais resistentes e produtivas sem a introdução de novas estirpes que comprometessem a biodiversidade do ecossistema.

Conclusões

Ao longo destes últimos 25 anos, a equipa do LNETI/INETI/LNEG tem desenvolvido conhecimento na manutenção e cultivo de microalgas marinhas, focando os seus estudos em potenciais aplicações destes microrganismos em diversas áreas como a alimentar, farmacêutica, “nutracêutica”, energia e ambiente. Demonstrou-se que muitas destas aplicações contribuem para a melhoria da qualidade de vida do cidadão. Como instituição nacional de I&D, o LNEG tem apostado e aposta nesta área, considerada estratégica num país virado para o mar. De referir que Portugal possui a 3ª maior Zona Económica Exclusiva (ZEE) da União Europeia e a 11ª do mundo com 1 727 408 km² e que 11% da ZEE da União Europeia pertence a Portugal, estando em curso um pedido de extensão da ZEE para 3 milhões de Km² pelo que se justifica um forte investimento em I&D na área das microalgas marinhas.

Referências bibliográficas

Couto RM, Simões PC, Reis A, Silva TL, Martins VH, Vicente YS (2010) Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Engineering in Life Sciences* 10(2): 158-164.

Lopes da Silva T, Calado C, Silva N, Mendes R, Alves S, Vasconcelos J, Reis A (2006) Effects of hydrocarbon additions on gas-liquid mass transfer coefficients in biphasic bioreactors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 11: 245-250.

Lopes da Silva T, Mendes A, Mendes R, Calado V, Alves S, Vasconcelos J, Reis A (2006a) Effect of n-dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33: 408-416.

Lopes da Silva T, Reis A (2008) The use of multi-parameter flow cytometry to study the impact of n-dodecane additions to marine dinoflagellate microalga *Cryptocodinium cohnii* batch fermentations and DHA production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 875-887.

Mendes A, Guerra P, Madeira P, Ruano F, Lopes da Silva T, Reis A (2007) Study of the DHA production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1209-1215. Mendes A, Lopes da Silva T, Reis A (2007a) DHA extraction and purification from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Food Technology and Biotechnology* 45(1): 38-44.

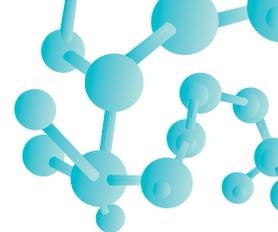
Mendes A, Reis A, Vasconcelos R, Guerra P & Lopes da Silva T (2008) *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. *Journal of Applied Phycology* 21: 199-214.

Reis A, Gouveia L, Fernandes HM, Empis J, Novais JM (1996) Eicosapentaenoic acid production by the microalga *Phaeodactylum tricorutum* using continuous culture. *Bioresource Technology* 55: 83-88.

Reis A, Lopes da Silva T (2008) The Use of Multi-Parameter Flow Cytometry to Study the Impact of n-Dodecane Additions to Marine Dinoflagellate Microalga *Cryptocodinium cohnii* Batch Fermentations and DHA Production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 875-887.

Veloso V, Reis A, Gouveia L, Fernandes HL, Empis J, Novais JM (1991) Lipid Production by *Phaeodactylum tricorutum*. *Bioresource Technology* 38: 115-119.





Esponjas marinhas: do mar à farmácia

Ana I.S. Esteves¹, Rodrigo Costa²

¹Centre for Marine Bio-Innovation, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, The University of New South Wales, Kensington - Sydney 2052 NSW, Australia

²Centro de Ciências do Mar, Universidade do Algarve, Gambelas, Faro, Portugal

E-mail: a.esteves@unsw.edu.au; rscosta@ualg.pt

Resumo

Evidências recentes sugerem que compostos bioativos isolados de esponjas marinhas são, em grande parte, produzidos por membros de uma microbiota altamente diversificada que se encontra associada a estes animais. Dada a recalcitrância destes microorganismos simbioses ao cultivo em laboratório, a aplicação de técnicas de metagenómica, baseadas na análise do DNA comunitário extraído a partir do organismo hospedeiro, tem sido fundamental no estudo da sua diversidade e função. Este artigo aborda o uso da metagenómica na descoberta de novos *clusters* de genes e vias metabólicas envolvidos na biossíntese de compostos bioativos com origem em esponjas marinhas e sua microbiota associada.

Introdução

As esponjas, ou Porífera, são animais filtradores sésseis que habitam os mais variados ambientes aquáticos, desde zonas fluviais às fossas abissais oceânicas. Estes organismos constituem um marco na história evolutiva do nosso planeta, sendo a linhagem mais antiga de metazoários existentes. Estima-se que os Porífera tenham surgido na era Neoproterozóica há mais de 635 milhões de anos [1]. Estudos recentes apontam para que as esponjas possam também ter desempenhado um papel preponderante na oxigenação dos oceanos [2].

Uma vez que estes organismos se encontram fixos ao substrato bentónico durante a maior parte da sua vida – com excepção da fase larvar – e dada a sua morfologia relativamente simples, desenvolveram, entre outras, uma estratégia adaptativa essencialmente química como forma de defesa e competição [3]. Muitos destes compostos apresentam novidade química em termos de estrutura e reactividade, demonstrando actividades biológicas extremamente interessantes e, não raras vezes, mais eficazes do que fármacos já introduzidos no mercado [4].

A primeira vaga de biotecnologia de esponjas marinhas data da década de 50 com o trabalho pioneiro de Bergmann, na área de produtos naturais marinhos, que resultou na descoberta dos análogos de nucleósidos spongotimidina e spongouridina, isolados da esponja marinha *Cryptotethia crypta* [5]. Inicialmente estudados como potencial aplicação antitumoral, mais tarde vieram a servir de inspiração para a síntese do primeiro e mais conhecido fármaco de acção anti-HIV, o zidovudine ou AZT [6]. Na década de 80, o *National Cancer Institute* (EUA) iniciou um rastreio de actividade biológica onde as esponjas marinhas se destacaram como os mais prolíficos produtores de compostos bioativos [7] e continuam a permanecer no pódio, com mais de 350 novos compostos isolados anualmente [8]. Actualmente encontram-se no mercado quatro outros compostos com origem em esponjas

marinhas – citarabina e halicondrina B, na área da quimioterapia anticancerígena, e vidarabina e aciclovir, com acção antiviral [9].

Durante a década de 70, vários microbiologistas reconheceram a existência de consórcios microbianos no interior das esponjas marinhas [10]. O aparecimento de novas ferramentas de biologia molecular proporcionou um novo olhar, principalmente a partir dos anos 90, sobre o desconhecido e verdadeiramente complexo mundo bacteriano que habita estes hospedeiros [11] e o presumível envolvimento de síntese bacteriana nos compostos bioativos até então atribuídos às esponjas [12].

Policetídeos de origem marinha

De todos os compostos bioativos encontrados nas esponjas marinhas, os policetídeos são os que têm recebido maior atenção, devido não só à sua variedade e novidade de estruturas, mas principalmente porque muitos deles são reconhecidos como fármacos importantes com actividades biológicas muito abrangentes, como são exemplo a eritromicina, rapamicina, lovastatina e a epotilona, com actividades antibiótica, imunossupressora, antiolesterol e anticancerígena, respectivamente.

Estes compostos são sintetizados por um conjunto de enzimas designado por policetídeo sintases (ou PKS, do inglês *polyketide synthases*), que catalizam a condensação sucessiva de moléculas provenientes do metabolismo primário (como o acetil-CoA) formando polímeros de β -cetoacetil, que podem depois sofrer modificações pós-condensação [13]. Estas enzimas estão geralmente codificadas em agrupamentos de genes que podem ser tão complexos como os próprios compostos por eles produzidos.

A análise metagenómica de várias comunidades ambientais marinhas demonstrou a existência, em esponjas marinhas, de agrupamentos de genes codificadores de policetídeo sin-

Aspectos a considerar

Esforço de amostragem, replicação e biomassa. Enriquecimento de microorganismos com substratos seleccionados

Eficiência de *screenings* por genes e metabolitos microbianos

Peso molecular, quantidade, pureza e integridade do DNA metagenómico

Calibração do tamanho dos fragmentos de DNA

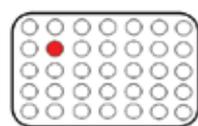
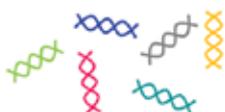
Escolha do vector: tamanho do inserto, adaptabilidade do hospedeiro, marcação e selecção do vector

Utilização de vários hospedeiros heterólogos em *screenings* funcionais?

Esonja



Extracção directa do DNA ("holobionte")



Screening fenotípico: determinação de actividades *in vitro*

Screening genotípico: procura por sequências de DNA via PCR ou hibridação

Etapas metodológicas

Extracção indirecta do DNA ("microbioma")

Extracção directa do DNA ("holobionte")

Lise celular, extracção e purificação do DNA

Metagenoma do holobionte ou da microbiota associada

Fragmentação do DNA: métodos físicos ou enzimas de restrição

Clonagem de fragmentos de DNA em vector apropriado

Construção da biblioteca metagenómica: transformação do hospedeiro heterólogo com DNA exógeno.

Screening dos transformantes: funcional e/ou genotípico

Separação das células microbianas

Pellet

Tecnologias de sequenciação em massa

Caracterização a fundo de diversidade e função



Assemblagem de metagenomas e anotação de genes

Sequenciação de insertos responsáveis por bioactividades

Figura 1 - Abordagem metagenómica à prospecção de bioactividades em esponjas marinhas. A construção de uma biblioteca metagenómica em um hospedeiro heterólogo (p.ex. *Escherichia coli*) inicia-se com a extracção do DNA do holobionte (organismo hospedeiro e microbiota associada) ou apenas do seu microbioma. As chamadas tecnologias de sequenciação de última geração (do Inglês *next generation sequencing technologies*), como *454-pyrosequencing* e *Illumina*, têm sido fundamental na descrição da microbiota associada às esponjas marinhas quer pela caracterização de todo o metagenoma, quer pela análise da diversidade microbiana a partir de amplicões do genes codificadores do RNA ribossomal (p.ex. genes 16S e 18S rRNA). Fragmentos de DNA extraídos do holobionte são inseridos em moléculas de DNA circulares colectivamente chamadas de "vectores", como plasmídeos, cosmídeos e fósídeos, cada qual com suas respectivas vantagens e desvantagens respeitante ao tamanho dos insertos de DNA exógeno que podem abrigar e à sua estabilidade em uma célula hospedeira. Células do organismo heterólogo transformadas com DNA oriundo do holobionte são submetidas a testes fenotípicos e genotípicos, idealmente de natureza *high-throughput*, em busca de bioactividades várias, como bactericidas, fungicidas e antitumorais, e dos *clusters* génicos responsáveis por tais bioactividades, respectivamente. Diversos hospedeiros heterólogos podem ser empregados a uma mesma biblioteca metagenómica, de forma a maximizar a observação de *scores* positivos através de uma maior gama de compatibilidade entre os circuitos metabólicos disponíveis às células hospedeiras e a expressão dos genes herdados por transformação. Esquema adaptado de Van Elsland et al. [21].

tases que, dadas as suas características, pensa-se pertencerem à comunidade microbiana associada [14]. Em alguns casos, foi possível detectar a presença de genes de PKS em microorganismos cultivados em laboratório [15], mas a grande maioria - 80 a 90% - da comunidade bacteriana associada às esponjas marinhas permanece ainda recalcitrante ao cultivo. A extracção destes compostos directamente de esponjas recolhidas no seu habitat natural não representa uma alternativa viável dada a sua baixa concentração no organismo, geralmente em ordem inferior a mg de composto

por kg de esponja. Outros métodos dependentes de cultura - a maricultura, a aquicultura e a cultura celular - também não demonstraram constituir um bom recurso, uma vez que, para além de se manter o problema do baixo rendimento, muitas das esponjas dificilmente conseguem manter-se e/ou a variação das condições ambientais provoca alterações que rompem a produção dos compostos de interesse. Nos métodos independentes de cultivo, a síntese química (total ou parcial) surgiria como opção lógica mas, dada a complexidade de muitos destes compostos, a sua síntese em larga escala

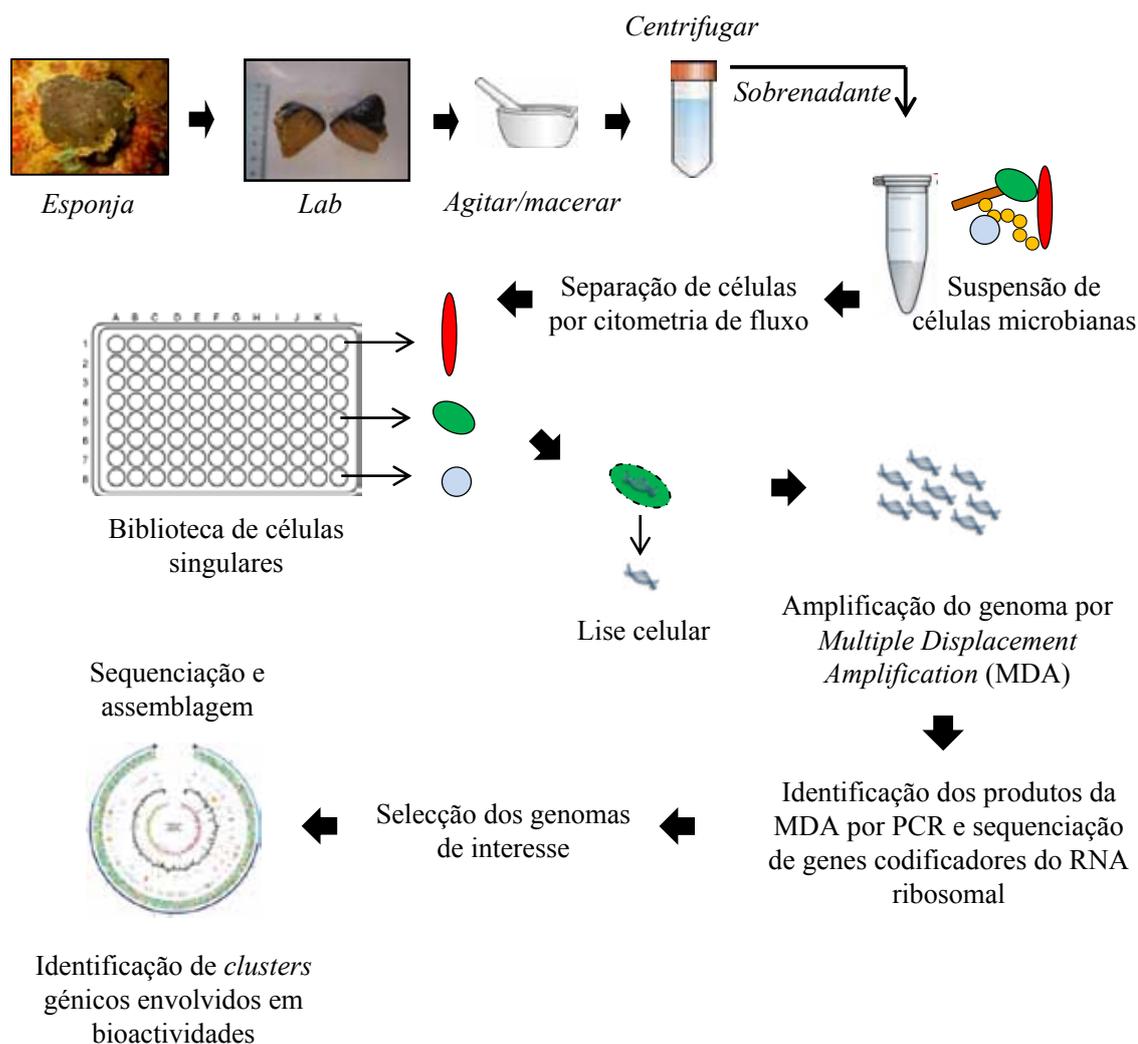


Figura 2 - Aplicação da genômica de células singulares ao estudo de microorganismos não cultiváveis associados a esponjas marinhas.

revela-se, muitas vezes, impraticável e/ou economicamente inviável [16].

Todos estes constrangimentos constituem um problema de provisão que tem impedido ou retardado o desenvolvimento de muitas destas moléculas como fármacos. É, portanto, crucial obter uma solução biotecnológica que permita um fornecimento constante destes compostos. A metagenômica oferece a possibilidade de estudar vias metabólicas secundárias que não são expressas em condições normais de cultivo (por exemplo, vias metabólicas partilhadas entre o microorganismo e o seu hospedeiro, ou exclusivas de microorganismos não cultiváveis) através da obtenção de bibliotecas genómicas que podem abranger milhares de genes de interesse. Estas podem depois ser clonadas e expressas em organismos de fácil manipulação e cultivo (i.e., hospedeiros heterólogos) permitindo posteriormente o rastreio de compostos bioativos ou genes de interesse e uma produção em larga escala em processos de fermentação industrial (Fig. 1). Mais recentemente, a utilização da chamada genômica de células singulares veio incorporar-se ao vasto arsenal de estratégias independentes de cultivo como uma elegante alternativa à busca de agrupamentos gênicos de interesse biotecnológico no microbioma das esponjas marinhas (Fig. 2).

Por possibilitar a análise do conteúdo genómico de células individuais destacadas fisicamente (usualmente por citometria de fluxo) da complexa comunidade simbiótica, esta abordagem permite também a associação directa entre as potenciais funções e a identidade de um dado microorganismo simbiote. A descoberta de regiões codificantes de novas policetídeo sintases nos genomas de bactérias pertencentes aos filos *Chloroflexi*, *Poribacteria* e *Tectomicrobia*, notáveis por abrigarem espécies tipicamente não cultiváveis, é exemplo fidedigno da adequação da genômica de células singulares ao estudo da identidade e função dos microorganismos associados às esponjas marinhas [12, 17, 18].

Conclusões e Perspectivas

O uso da metagenômica associada à expressão heteróloga das vias metabólicas que sintetizam os compostos de interesse apresenta grande potencial para desvendar a diversidade química da comunidade microbiana associada às esponjas marinhas [19] e tornar estes animais de organização simples em bastiões da importância dos produtos naturais marinhos na área farmacêutica. Neste contexto, o emprego da genômica de células singulares [12, 18] revela-se particularmente promissor não só na descoberta de novos agrupamentos gé-

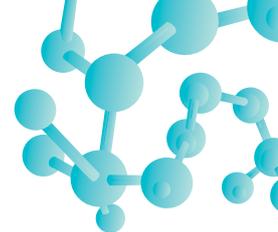
nicos, como também na identificação dos microorganismos responsáveis pelos correspondentes compostos bioativos e respectivas vias biossintéticas. Enquanto detentoras de uma comunidade microbiana vasta, geneticamente distinta e quimicamente fértil, e dada a sua riqueza taxonómica representada por cerca de 8.500 espécies validadas e equivalente número de espécies a catalogar [20], as esponjas marinhas destacam-se notoriamente como uma das mais promissoras fontes modernas de recursos naturais com putativo uso em futuras aplicações biotecnológicas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através dos projectos PTDC/MAR/101431/2008, PTDC/BIA-MIC/ 3865/2012 e PEst-C/MAR/LA0015/2011. Suporte parcial foi obtido pelo “European Regional Development Fund (ERDF)” através do programa COMPETE (“Operational Competitiveness Programme”).

Referências

- [1] Love GD, Grosjean E, Stalvies C, Fike DA, Grotzinger JP, Bradley AS et al. (2009) Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. *Nature* 457: 718-715.
- [2] Mills DB, Ward LM, Jones C, Sweeten B, Forth M, Treusch AH, Canfield D (2014) Oxygen requirements of the earliest animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(11): 4168-4172.
- [3] Pawlik JR (1993) Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews* 93(5): 1911-1922.
- [4] Newbold RW, Jensen PR, Fenical W, Pawlik JR (1999) Antimicrobial activity of caribbean sponge extracts. *Aquatic Microbial Ecology* 19: 279-284.
- [5] Bergmann W, Burke DC (1995) Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. *Journal of Organic Chemistry* 20(11): 1501-1507.
- [6] Gochfeld DJ, Sayed KAE, Yousaf M, Hu JF, Bartyzel P, Dunbar DC et al. (2003) Marine natural products as lead anti-HIV agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 3: 401-424.
- [7] Cragg GM, Newman DJ, Yang SS (2006) Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI Experience. *Journal of Natural Products* 69: 488-498.
- [8] Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR (2014) Marine natural products. *Natural Product Reports* 31: 160-258.
- [9] Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S (2014) Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Marine Drugs* 12(2): 1066-1101.
- [10] Vacelet J, Donadey C (1977) Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 30(3): 301-314.
- [11] Vogel G (2008) The inner lives of sponges. *Science* 320(5879): 1028-1030.
- [12] Wilson MC, Mori T, Rückert C, Uria AR, Helf MJ, Takada K, et al. (2014) An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* 506: 58-62.
- [13] Meier JL, Burkart MD (2009) The chemical biology of modular biosynthetic enzymes. *Chemical Society Reviews* 38: 2012-2045.
- [14] Woodhouse JN, Fan L, Brown MV, Thomas T, Neilan BA (2013) Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges. *The ISME Journal* 7: 1842-1851.
- [15] Esteves AIS, Hardoim CCP, Xavier JR, Gonçalves, JMS, Costa R (2013) Molecular richness and biotechnological potential of bacteria cultured from Irciniidae sponges in the north-east Atlantic. *FEMS Microbiology Ecology* 85: 519-536.
- [16] Sipkema D, Osinga R, Schatton W, Mendola D, Tramper J, Wijffels RH (2005) Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell or synthesis? *Biotechnology and Bioengineering* 90(2): 201-222.
- [17] Siegl A, Hentschel U (2010) PKS and NRPS gene clusters from microbial symbiont cells of marine sponges by whole genome amplification. *Environmental Microbiology Reports* 2: 507-513.
- [18] Siegl A, Kamke J, Hochmuth T, et al. (2011) Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. *The ISME Journal* 5: 61-70.
- [19] Kennedy J, Marchesi JR, Dobson ADW (2007) Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 11-20.
- [20] van Soest RWM, Boury-Esnault N, Vacelet J, Dohrmann M, Erpenbeck D, De Voogd NJ et al. (2012) Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS ONE* 7: e35105.
- [21] van Elsas JD, Costa R, Jansson J, Sjöling S, Bailey M, Nalin R, Vogel TM, Van Overbeek L (2008) The metagenomics of disease-suppressive soils – experiences from the METACONTROL project. *Trends in Biotechnology* 26: 591-601.



Isolamento e seleção de estirpes locais de *Haematococcus pluvialis* Flotow para produção de astaxantina

E. D. Xavier¹, J. Furnas², J. M. Azevedo¹, A. Reis³, L. Teves², G. Mota², A. I. Neto^{1,4}

¹CIRN – Centro de Investigação em Recursos Naturais & Grupo de Biologia Marinha, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, 9501-801 Ponta Delgada, Açores, Portugal

²ALGICEL – Biotecnologia e Investigação, Ponta Delgada, Portugal

³LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Unidade de Bioenergia, Lisboa, Portugal

⁴CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, MAR – Laboratório de Investigação Macaronésica Insular, Porto, Portugal

Resumo

As microalgas nativas estão bem adaptadas aos fatores abióticos e bióticos locais predominantes e quando cultivadas localmente é fundamental a seleção de estirpes com potencial biotecnológico. Duas estirpes locais de *H. pluvialis* foram identificadas e isoladas de poças de água doce em locais distintos. Foram cultivadas por um período de 60 dias em meio de cultura MES esterilizado em câmara de cultura. Medições periódicas foram realizadas para avaliar a produção de biomassa e acumulação de astaxantina. As estirpes locais apresentaram no geral a maior e menor produção de biomassa e acumulação de astaxantina o que demonstra a variabilidade entre estirpes da mesma espécie. Por conseguinte, estirpes locais devem ser avaliadas quando se considera uma exploração em grande escala.

Introdução

Muitas espécies de microalgas permanecem desconhecidas para a ciência, apesar do seu já reconhecido potencial biotecnológico [1]. Que se saiba, apenas 15 espécies de microalgas conhecidas atualmente são cultivadas com a finalidade da respetiva utilização nas indústrias nutracêuticas, cosméticas, rações de aquacultura, ou tratamento de águas residuais [2].

Um dos processos mais recentes, baseado nas microalgas é a produção de astaxantina a partir de *H. pluvialis* Flotow, Chlorophyta. A astaxantina é um pigmento carotenóide de elevado valor económico com importantes aplicações nas indústrias nutracêuticas, cosméticas, alimentos e rações [3]. *H. pluvialis* é uma espécie cosmopolita, com registos em todos os continentes com exceção da Antártida. Na natureza ocorre geralmente em pequenas poças efémeras criadas pela chuva dando-lhes uma cor vermelha brilhante devido à acumulação de astaxantina pela espécie. É uma microalga unicelular, biflagelada e uninucleada com células fechadas por uma parede ovoide, elipsoide, elipsoide-cilíndrica ou quase globosa [4].

A quantidade de astaxantina acumulada por *H. pluvialis* varia drasticamente entre estirpes da mesma espécie. De acordo com Borowitzka [5], a biomassa seca de *H. pluvialis* pode conter 1,5 a 8% de astaxantina. Devido ao elevado valor comercial da astaxantina, cerca de U.S. \$ 2 500 por quilo [6], a seleção da estirpe mais adaptada à sua acumulação é fundamental.

Espécies de microalgas nativas têm sido naturalmente se-

leccionadas nas suas respetivas regiões na medida em que estão, *a priori*, melhor adaptadas aos fatores bióticos e abióticos prevaletentes e, portanto, estão evolutivamente preparadas para a produção de bio recursos locais [7].

Este trabalho compara a produtividade em termos de biomassa e de acumulação de astaxantina entre duas estirpes locais de *H. pluvialis* (coletadas na ilha de São Miguel, Açores) e uma não local.

Obtenção e preparação das estirpes de *H. pluvialis*

A estirpe de *H. pluvialis* não indígena foi adquirida à coleção de culturas da Universidade do Texas (UTEX # 2505) [8]. As duas estirpes locais foram coletadas em poças de água doce em dois locais distintos da ilha de São Miguel, Açores (Santo António no Norte e Povoação no Sul).

Para o isolamento, as amostras recolhidas foram inoculadas em meio agarizado e esterilizado MES utilizando placas de Petri. As placas de Petri foram seladas para evitar a contaminação e incubadas a 25 °C sob iluminação com lâmpadas fluorescentes, por um período de 10 dias. As culturas foram examinadas diariamente para controlo do crescimento e realização do isolamento no ponto ótimo. As colónias de células desenvolvidas nos agares foram isoladas sob um microscópio invertido e inoculadas para tubos de ensaio com 5 ml de meio MES esterilizado. Os tubos resultantes foram incubados sob as condições anteriormente descritas e examinados para acompanhamento do crescimento e aferição da dominância das espécies desejadas, utilizando microscó-

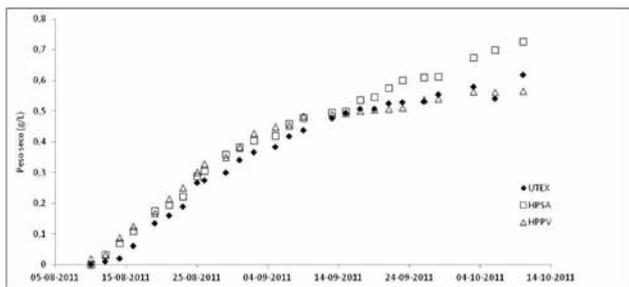


Figura 1 – Curvas de crescimento de duas estirpes locais de *H. pluvialis* (HPSA e HPPV) e uma não local (UTEX).

pio ótico. Os passos descritos anteriormente foram repetidos até que culturas puras foram obtidas, tendo-se isolado duas estirpes de *H. pluvialis* locais, HPSA (proveniente de Santo António) e HPPV (proveniente da Povoação). Todas as manipulações foram realizadas em câmara de fluxo laminar, para assegurar condições assépticas.

Condições de cultura

Tubos de ensaio de vidro de trinta mililitros foram inoculados com meio MES esterilizado num total de 80 amostras por estirpe. As amostras foram cultivadas em câmara de cultura (Sanyo versatile environmental test chamber MLR – 351) a 25 °C sob iluminação de 8 000 Lux e um fotoperíodo de 12/12. Os tubos foram agitados, numa base diária, utilizando um misturador de vórtice a fim de reduzir a sedimentação. A produção foi realizada em *batch*, por um período de 60 dias, até que o crescimento e a acumulação de astaxantina estava completa, tal foi confirmado devido aos pesos secos e percentagens de astaxantina constantes.

Métodos Analíticos

Métodos analíticos clássicos foram usados como referência. O número de células nas culturas foi determinado em câmara de contagem Neubauer por observação direta em microscópio ótico. A concentração de biomassa foi determinada através de medições de peso seco. Para este efeito, filtraram-se 25 ml de cultura, através de filtros de fibra de vidro de 0,45 µm (Whatmann), os quais foram posteriormente secos em estufa a 75 °C até se observar peso constante. O teor total de carotenóides foi determinado por extração e quantificação dos carotenóides por espectrofotometria de acordo com Haard [9].

Resultados/discussão

A análise da Figura 1 mostra que a estirpe local HPSA apresentou o maior crescimento, tendo o menor crescimento sido verificado na estirpe local HPPV. Numa primeira fase da curva, podemos ver um maior crescimento das duas espécies locais e uma separação da estirpe não local. A segunda fase da curva de crescimento mostra uma aproximação entre as estirpes HPPV e UTEX e uma clara separação da estirpe HPSA. A produtividade final variou entre 0,73 g/L na estirpe HPSA, 0,62 g/L na estirpe UTEX e 0,57 g/L na estirpe HPPV.

A produtividade observada neste ensaio foi substancialmente inferior ao descrito em outros trabalhos tais como Boussiba *et al.* [10], facto que está provavelmente relacionado com a

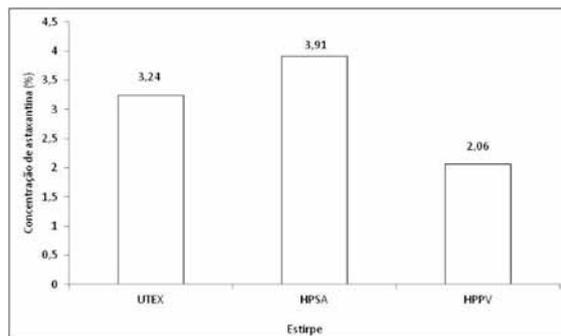


Figura 2 – Concentração de astaxantina em biomassa seca de duas estirpes locais de *H. pluvialis* (HPSA e HPPV) e uma não local (UTEX).

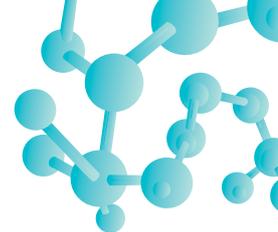
ausência de agitação constante da cultura e injeção de CO₂. Estes dois parâmetros devem ser tidos em consideração em estudos futuros. A diferença entre as estirpes foi de novo observada na acumulação de astaxantina (Figura 2). HPSA acumulou um total de 3,91% de astaxantina em peso seco, UTEX 3,24% e HPPV 2,06%. Isto corresponde a um aumento de 21% entre UTEX e HPSA e 90% entre HPPV e HPSA. Estas diferenças são maiores do que as encontradas anteriormente.

A grande variabilidade observada entre estirpes em termos de acumulação de astaxantina está de acordo com Borowitzka [5], que mostra que *H. pluvialis* pode conter entre 1,5 e 8% astaxantina na biomassa seca.

O resultado referente à maior produtividade de biomassa e acumulação de astaxantina pela estirpe local HPSA é muito promissor pois sugere que deva ser considerada como uma potencial candidata para futuras produções de astaxantina em maior escala, nas condições climáticas dos Açores. Decorre atualmente investigação no sentido de testar este potencial num ciclo mais alargado de produção.

Referências

- [1] Raja R, Hemaiswarya S, Kumar NA, Sridhar S, Rengasamy R (2008) A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* 34: 77 – 88.
- [2] Chen F (2008) Microalgae and their biotechnological potential. *Journal of Biotechnology* 136: 519 – 526.
- [3] Guerin M, Huntley ME, Olaizola M (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* 21: 210 – 216.
- [4] Guiry MD, & Guiry GM (2014) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 20 April 2014.
- [5] Borowitzka MA (1998) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70: 313 – 321.
- [6] Cysewski GR, Todd Lorenz R (2004) Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential. *Biotechnology and Applied Phycology* 281 – 288.
- [7] Wilkie AC, Edmundson SJ, Duncan JG (2011) Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy for Sustainable Development* 15: 365 – 371.
- [8] Starr RC, Jeikus JA (1993) UTEX: the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology* 29: 1 – 106.
- [9] Haard NF (1988) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnology Letters* 9: 609 – 614.
- [10] Boussiba S, Bing W, Yuan JP, Zarka A, Chen F (1999) Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters* 21: 601 – 604.



Hidrolisados proteicos com atividade biológica: uma alternativa para a valorização de subprodutos de pescado

Irineu Batista, Carla Pires, Bárbara Teixeira, Maria Leonor Nunes

IPMA, I.P. - Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Departamento do Mar e dos Recursos Marinhos, Divisão de Aquacultura e Valorização, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

A matéria-prima disponível

A nível mundial, a larga maioria dos *stocks* comerciais de pescado (cerca de 87 %) encontra-se num estado de sobre-exploração ou no limite máximo de exploração, o que se reflete na estabilização das capturas mundiais, desde o início dos anos 90, em cerca de 90 milhões de toneladas. A produção aquícola, por sua vez, tem apresentado um crescimento quase exponencial desde 1980, estimando-se que tenha atingido, em 2012, cerca de 67 milhões de toneladas. Em paralelo, registam-se rejeições a bordo que atingem anualmente, em média, cerca de 7 milhões de toneladas.

Na indústria de processamento do pescado também se geram grandes quantidades de subprodutos que dependem do sector e do grau de processamento. Assim, no caso dos produtos congelados, os subprodutos podem representar 10 a 50 % da matéria-prima, enquanto no conserveiro rondam 40 %. Estes subprodutos são constituídos por cabeças, vísceras, espinhas, escamas, pedaços, peles, exemplares inteiros ou produtos rejeitados. A composição química deste material é semelhante à do pescado e inclui proteínas de elevado valor biológico com todo o perfil de aminoácidos, ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa da série $\omega 3$, como o EPA e o DHA, alguns minerais importantes e ainda diversos compostos com aplicações em nutracêuticos, cosméticos e fármacos. Estes subprodutos são usualmente convertidos em farinha e óleo de peixe, importantes ingredientes utilizados na confeção de rações, em particular, para aquacultura.

Os hidrolisados proteicos na valorização do pescado

As proteínas são passíveis de maior valorização como, por exemplo, na produção de hidrolisados proteicos (HP). Estes produtos são preparados a partir das proteínas por hidrólise enzimática, usando-se para o efeito enzimas que podem ser de origem animal (mamíferos, peixes), vegetal (papaia, figo, ananás) ou microbiana (diferentes estirpes como *Bacillus amyloliquefaciens*). A fim de evitar a ação de enzimas endógenas no pescado e garantir assim uma maior repetibilidade do processo enzimático, tem-se procedido à inativação destas enzimas por aquecimento prévio da matéria-prima. Porém, esta operação leva a uma redução do rendimento do processo ao tornar as proteínas menos suscetíveis à hidrólise enzimática.

O processo de hidrólise pode-se realizar também em contínuo, recorrendo a reatores equipados com membranas de ultrafiltração em que o permeado é a solução dos péptidos formados. Após a hidrólise das proteínas segue-se uma sequência de operações que envolvem a inativação da enzima, a eliminação do material não hidrolisado (espinhas, peles, proteínas insolúveis), a concentração da solução de hidrolisado proteico e a secagem. A hidrólise enzimática permite igualmente a libertação dos lípidos que, no caso da matéria-prima ser proveniente de espécies gordas, podem ser recuperados visto apresentarem na sua composição ácidos gordos polinsaturados muito valorizados. Também neste caso pode ser recomendável a adição de antioxidantes para limitar a oxidação destes ácidos gordos.

Alternativamente a enzima usada no processo é imobilizada num suporte o que, além de permitir a sua reutilização, evita o recurso a métodos agressivos para desativar a enzima. A solubilização de proteínas por bactérias lácticas ou outros microrganismos, incluindo bactérias proteolíticas, tem merecido igualmente muito interesse, em particular na desproteínização do exoesqueleto de crustáceos para a extração de quitina. Um artigo recente [1] apresenta uma extensa revisão bibliográfica sobre o recurso a métodos biológicos para extrair proteínas. Venugopal *et al.* [2] testaram a eficácia de três estirpes bacterianas imobilizadas em esferas de alginato de cálcio na hidrólise do músculo de uma espécie de baixo valor comercial, *Johnius dissumeri*. A estirpe mais eficiente foi *Bacillus megaterium* e as esferas de alginato de cálcio eram estáveis durante cerca de um mês. Mais recentemente [3], foi estudada a atividade biológica de HP de restos da filetagem de escamudo obtidos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, usando como material de partida HP previamente preparados com Alcalase. Estes autores verificaram que os HP obtidos após a segunda hidrólise com a levedura apresentavam o dobro da atividade biológica dos HP de partida.

As atividades biológicas dos HP

A hidrólise das proteínas leva à libertação de péptidos com diferentes massas moleculares e sequências de aminoácidos. Estas sequências apresentam atividades biológicas muito diversas que apenas se manifestam quando não se encontram incorporadas na cadeia proteica. Por conseguinte, uma variável importante a controlar no processo hidrolítico é o grau de hidrólise o qual vai determinar muitas das propriedades funcionais e biológicas dos HP obtidos.

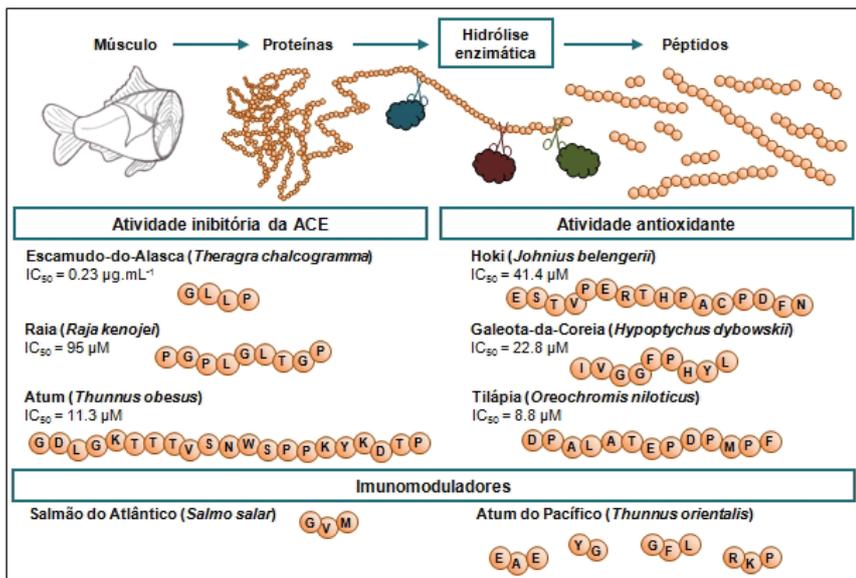


Figura 1 – Esquema da hidrólise enzimática e exemplos de peptídeos com propriedades biológicas extraídos de pescado. Os aminoácidos são apresentados de acordo com o código de uma letra segundo M. O. Dayhoff. Adaptado de Kim e Wijesekara [4].

Os HP têm sido utilizados na área alimentar em virtude da sua elevada solubilidade em soluções aquosas numa larga gama de pH e de força iónica. Neste sentido têm sido utilizados em vários tipos de produtos da pesca (polpas de peixe e filetes) para melhorar a capacidade de retenção da água, quer em produtos congelados quer durante a cozedura, podendo substituir os fosfatos. Também tem sido referida a possibilidade de utilização como ingrediente para estabilizar emulsões.

A atividade antioxidante dos HP tem sido demonstrada em múltiplos trabalhos. Porém, os mecanismos envolvidos nesta atividade não são bem conhecidos, admitindo-se que possam incluir processos de doação de hidrogénio, eliminação de radicais hidroxilo, quelação de metais de transição e desativação de compostos oxigenados reativos. Em múltiplos trabalhos em que se identificou a sequência dos aminoácidos dos peptídeos com elevada atividade antioxidante procuraram-se estabelecer relações entre a respetiva estrutura e esta atividade. Assim, de entre vários fatores têm sido destacados: a massa molecular, sendo mais ativos os peptídeos com 2 a 10 aminoácidos; a presença de aminoácidos hidrofóbicos (Val ou Leu) e aromáticos (Tyr, His, Trp ou Phe); a conformação dos peptídeos pois alguns exibem atividade muito superior à da mistura equimolecular dos aminoácidos livres destes peptídeos. Na figura 1 apresentam-se as sequências de peptídeos isolados de HP de pescado com elevada atividade antioxidante.

Outra importante atividade biológica dos HP é a sua capacidade inibidora da ACE (enzima conversora da angiotensina), enzima que catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Este peptídeo é um potente vaso constritor que atua diretamente nas células do músculo liso vascular. Existem diversos inibidores específicos da ACE que têm sido usados em fármacos anti-hipertensivos e, embora alguns sejam bem tolerados pelos doentes, outros provocam efeitos secundários desagradáveis. Em contrapartida, os peptídeos derivados das proteínas são considerados mais seguros, apresentam propriedades multifuncionais e são facilmente absorvidos.

De um modo geral, considera-se que os peptídeos com esta atividade apresentam massas moleculares inferiores a 1500 Da. Além disso, tem-se verificado que a existência no terminal carboxílico de aminoácidos como Pro e Phe favorece a atividade inibidora dos peptídeos. De um modo geral, a inibição da ACE é conseguida por peptídeos hidrofóbicos que apresentam elevada afinidade para as subunidades da ACE. Na figura 1 apresentam-se alguns peptídeos inibidores da ACE e isolados de HP.

Os HP podem também apresentar peptídeos com atividade hormonal ou com capacidade para modular a concentração de algumas hormonas ou citoquinas presentes no sangue. O efeito no sistema nervoso de HP obtidos de diferentes fontes proteicas tem sido demonstrado em diferentes trabalhos. Estes peptídeos do tipo opióide têm sido detetados em HP de pescado, encontrando-se no mercado diferentes produtos preparados com HP de pescado, apresentando alegações de atividade ansiolítica e reguladora da produção de adrenalina e cortisol ou ainda capacidade para melhorar a memória a curto e longo prazo.

O efeito imunomodulador de diversos peptídeos foi também descrito, representando uma alternativa ao uso de antibióticos no controlo de doenças infecciosas, em particular, em aquacultura. Os principais peptídeos responsáveis por esta atividade em HP de organismos marinhos não foram identificados, mas pode estar relacionada com a presença de alguns peptídeos (Fig. 1) cuja atividade imunomoduladora está provada.

A diversidade de atividades biológicas exibidas pelos HP abre múltiplas perspectivas de aplicações como suplementos nutricionais ou em produtos com diferentes alegações nutricionais ou de saúde. Todavia, há ainda diversos aspetos a desenvolver que incluem a otimização de processos e a ampliação de uma escala laboratorial para outra a nível industrial.

No âmbito do projeto SECUREFISH (“Improving food security by reducing post harvest losses in the fisheries sector”, FP

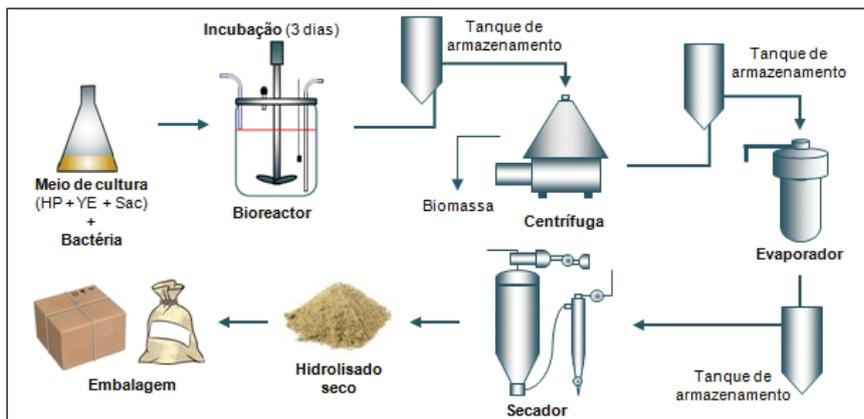


Figura 2 – Exemplo de uma sequência de operações seguidas na preparação de hidrolisados fermentativos. HP – hidrolisado proteico comercial; YE – extrato de levedura; Sac – sacarose.

7 EU project KBBE.2011.2.5-02) desenvolveu-se uma metodologia de preparação de HP, usando uma bactéria de origem marinha com atividade proteolítica e um HP comercial como meio de cultura. A sequência de operações seguida encontra-se esquematizada na Fig. 2. As melhores condições de produção de HP por esta via foram conseguidas utilizando um meio com 2 % de HP comercial após 72 horas de incubação. Os novos hidrolisados obtidos apresentavam poder redutor e capacidade antioxidante avaliada pelo DPPH: mais elevados do que o HP comercial usado no meio de cultura. Porém, as atividades antioxidante relativamente ao ABTS⁺ e quelante do Cu²⁺ eram semelhantes às do HP de partida.

Referências

- [1] Arbia W, Arbia L, Adour L, Amrane A (2013) Chitin extraction from crustacean shells using biological methods – A Review. *Food Technology and Biotechnology* 51 (1): 12–25.
- [2] Venugopal V, Alur MD, Nerkar DP (1989) Solubilization of fish proteins using immobilized microbial cells. *Biotechnology and Bioengineering* 33: 1098-1103.
- [3] Martínez-Alvarez O, Guimas L, Delannoy C, Fouchereau-Péron M (2008) Use of a commercial protease and yeasts to obtain CGRP-like molecules from saithe protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7853-7859.
- [4] Kim S-K, Wisjeseckara I (2013) Chapter 1. In: S.-K Kim, Ed., *Marine Proteins and Peptides*. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, pp. 1-39.

Bioprospeção de inibidores de DNase I para aplicação no desenvolvimento de vacinas de DNA

Salomé Magalhães¹, Duarte M. F. Prazeres^{1,2}, Inge W. Nilsen³, Gabriel A. Monteiro^{1,2}

¹IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological and Chemical Engineering, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

²Department of Bioengineering, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Portugal

³Nofima AS, Muninbakken 9-13 Breivika, PO Box 6122, NO-9291 Tromsø, Norway

Biotecnologia marinha

Os oceanos ocupam 4/5 da superfície da Terra e possuem uma grande parte da biodiversidade existente no planeta. A constatação de que a grande maioria dos organismos marinhos permanecem ainda desconhecidos tem impulsionado muitos cientistas e instituições a redirecionar a investigação biotecnológica para os oceanos. Embora recente, este novo ramo da Biotecnologia (i.e. a Biotecnologia Marinha) é normalmente divulgado como possuindo um vasto potencial de aplicação nos sectores industrial, farmacêutico, cosmético, alimentar e diagnóstico. Uma das áreas mais promissoras reside na utilização de organismos marinhos como fonte de moléculas bioactivas capazes de interagir com alvos biológicos específicos. De facto, várias substâncias de origem marinha foram já identificadas como possuindo actividade farmacológica relevante, tendo algumas delas inclusive recebido autorização de agências reguladoras para comercialização. A identificação de compostos farmacologicamente activos de origem marinha passa por conduzir de forma sistemática um processo de rastreio que envolve os seguintes passos: i) recolha do material biológico, ii) preparação das amostras, iii) testes de bioactividade, iv) purificação e v) identificação [1]. A detecção e isolamento deste tipo de compostos em vários grupos de organismos marinhos (p.ex. invertebrados, microrganismos e algas marinhas), em conjunto com o desenvolvimento e/ou optimização de técnicas de cromatografia, espectroscopia (p.ex. RMN, massa) e microscopia de alta resolução (p.ex. fluorescência confocal, AFM), entre outras, resulta não só na identificação fiável destas moléculas, como também na determinação das estruturas e funções que lhe estão inerentes [2].

Após esta identificação, a etapa seguinte consiste na produção sustentável das moléculas bioactivas de origem marinha. Este tipo de produção implica normalmente uma utilização sustentável dos recursos em causa de modo a evitar a sua sobre-exploração. Para isso é necessário implementar o chamado 'Triple Bottom Line', ou seja ter em conta três pilares fundamentais: i) ambiental; ii) económico e iii) social. Com base nesta filosofia é possível controlar eficazmente a disponibilidade dos recursos marinhos através de abordagens como síntese química, colheitas controladas, aquacultura, produção intensiva e transgénicos [3].

A descoberta sistemática de compostos marinhos originou já uma panóplia de moléculas com propriedades diversas. Como exemplos relevantes destacam-se ficolóides (essências, gelificantes, estabilizantes) [4] carotenóides (antioxidantes), ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) (fluidez membranar, metabolismo celular), proteínas/enzimas (antioxidantes, anti-inflamatórios), bromoditerpenos (antitumoral), ácido gambiérico (antimicótico), marinomicinas A-D (antibióticos antitumorais), entre outros. As áreas da medicina e farmacologia são sem dúvida as que mais têm a lucrar com estes novos compostos já que as estratégias tradicionais de desenvolvimento de novos fármacos são muitas vezes ineficazes face às necessidades da indústria farmacêutica em identificar de forma rápida e eficiente moléculas promissoras do ponto de vista do desenvolvimento pré-clínico e clínico [3,5,6].

Embora tenham sido identificados um grande número de substâncias bioactivas, algumas inclusive há já vários anos, só recentemente os primeiros medicamentos marinhos foram aprovados. Como exemplos destacam-se o Prialta® (analgésico), Yondelis® (antitumoral), Cytosar-U® (anticancerígeno) e Vira-A® (antiviral). Nas diferentes fases de estudo clínico podemos ainda encontrar os seguintes medicamentos em fase I: Bryostatín 1, Marizomib, E7974 (anticancerígenos), em fase II: Plinabulin, ILX-651 (anticancerígenos), Pseudopterosin A (cicatrizante), GTS-51 (esquizofrenia), entre outros e em fase III: E7389, TZT-1027 (anticancerígeno) [7].

Vacinas de DNA

As vacinas de DNA exibem numerosas vantagens face aos outros tipos de vacinas tradicionais (p.ex. vacinas vivas, vacinas atenuadas, vacinas de sub-unidades). Por exemplo, após a introdução do gene da proteína antigénica de interesse, esta é expressa nas células do hospedeiro na sua forma "natural" sendo a resposta imunitária dirigida ao antígeno exactamente como se fosse expressa pelo agente patogénico, mas evitando a presença do organismo completo. As vacinas de DNA são ainda capazes de induzir quer resposta humoral quer citotóxica, ao contrário das restantes, que para estimular ambas as vias de resposta imunitária necessitam de imunização com preparações vivas/atenuadas, as quais podem ter riscos. A estratégia de imunização por DNA origina ainda uma expressão prolongada do antígeno gerando memória

imunológica [8]. Outras vantagens reconhecidas incluem uma elevada segurança, facilidade de produção em larga escala e excelente estabilidade. Neste momento, quatro vacinas de DNA de aplicação veterinária são comercializadas em diferentes partes do mundo, tendo em vista a vacinação contra: i) a doença provocada pelo vírus do Nilo ocidental (West Nile Innovator) em cavalos, ii) a necrose hematopoiética infecciosa no salmão (Apex-IHN), iii) o melanoma canino (Oncept) e iv) a diminuição perinatal de mortalidade e morbilidade em suínos (LifeTide SW5) [8].

A principal desvantagem das vacinas de DNA reside na sua baixa imunogenicidade, obstáculo este que tem impedido a entrada no mercado de vacinas para utilização humana. No entanto, estudos recentes indicam uma aplicação promissora em áreas como as doenças infecciosas e alergénicas e como vacinas terapêuticas para tratamento de cancro e na regeneração de tecidos. Para que uma vacina de DNA esteja apta para aplicação clínica, necessita de apresentar níveis de expressão adequada do gene. Esta expressão pode ser controlada quer utilizando promotores e sequências de regulação da transcrição e tradução otimizados quer maximizando o número de cópias do gene que chegam ao núcleo, por minimização da sua degradação durante o tráfego celular [8,9]. Um dos pontos cruciais que permitirá aumentar a eficácia das vacinas de DNA consiste precisamente no desenvolvimento de estratégias que evitem a degradação do gene de interesse por nucleases endógenas das células do organismo receptor (p.ex. DNases).

Prospecção de inibidores de DNases de origem marinha

O principal objectivo deste trabalho consistiu na prospecção de moléculas bioactivas de organismos marinhos conhecidos e de fácil acesso (peixes e invertebrados), que pudessem ser aplicadas no desenvolvimento de vacinas de DNA. Mais especificamente, pretendeu-se pesquisar inibidores de DNases (p.ex. DNase I) que pudessem ser utilizados como adjuvantes de vacinas de DNA tendo em vista a minimização da degradação enzimática, e consequentemente o aumento da sua eficiência.

O processo de bioprospecção incidiu sobre amostras marinhas recolhidas e armazenadas pela empresa Nofima AS

(Tromsø, Noruega). As amostras seleccionadas provinham não só de diferentes espécies de peixes como também de invertebrados. Os lotes de matéria-prima utilizados foram triturados e liofilizados seguindo-se uma extracção com acetonitrilo. A massa sólida e demais partículas foram removidas por filtração e centrifugação, sendo as soluções clarificadas resultantes submetidas apenas a filtração para exclusão sequencial de moléculas de pesos moleculares superiores a 5 kDa. Os permeados finais (<5 kDa) foram por sua vez submetidos a secagem sob vácuo e posteriormente preparados para extracção de fase sólida (SPE) por meio de extracções com metanol e ácido trifluoroacético. Os materiais processados foram então aplicados em colunas de SPE (C18), permitindo assim separar os compostos marinhos em cinco fracções principais de acordo com um gradiente de acetonitrilo e tendo por base a interacção de fase reversa. Após evaporação, as amostras fraccionadas foram analisadas em termos de inibição da DNase I por um método de fluorescência, através da metodologia de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET), descrita em [10]. Como inibidor controlo utilizou-se ácido etilendiaminotetracético (EDTA), um agente quelante que remove iões Mg^{2+} do meio, diminuindo significativamente a actividade da DNase I.

Os resultados da avaliação das amostras seleccionadas quanto ao efeito inibitório na actividade enzimática da DNase I mostraram-se bastante promissores (Figura 1), em várias das espécies em estudo. Várias amostras evidenciaram uma capacidade superior de inibir a actividade de DNase I comparativamente ao inibidor controlo. Na presença dos inibidores putativos, a percentagem de inibição da actividade de DNase I situou-se entre os 33 e 100% para as amostras obtidas de peixes e entre os 48 e 100% para as amostras obtidas de invertebrados. Em alguns casos, as percentagens de inibição obtidas foram inclusive superiores ao valor registado com o inibidor controlo (i.e. > 80%).

A utilização de diferentes quantidades da mesma amostra (dados não apresentados) revelou uma esperada dependência em termos de dose. Este facto é importante não só para a optimização da quantidade ideal de inibidor a usar, como poderá também indicar que amostras com actividade inibidora menor ou igual ao controlo poderão eventualmente também ser consideradas.

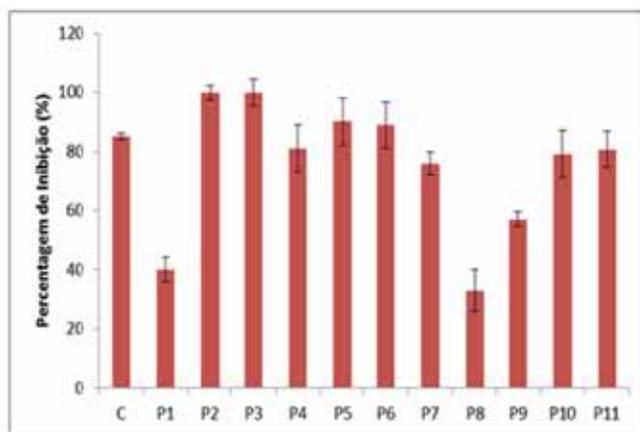
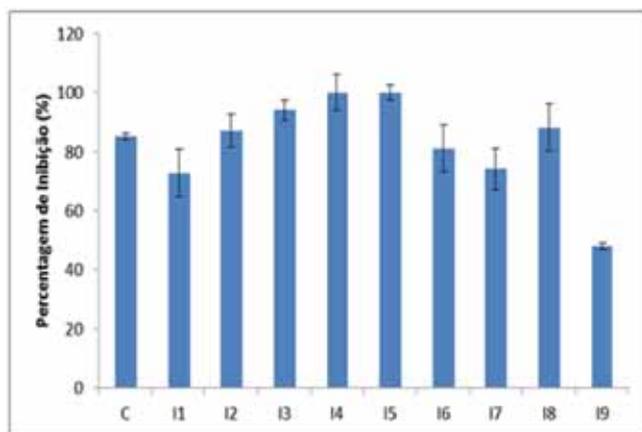


Figura 1 – Avaliação percentual do efeito inibitório das amostras seleccionadas de invertebrados (I), a azul, e de peixes (P), a vermelho, comparativamente ao efeito inibitório do EDTA, controlo (C), na inibição da actividade da enzima DNase I.

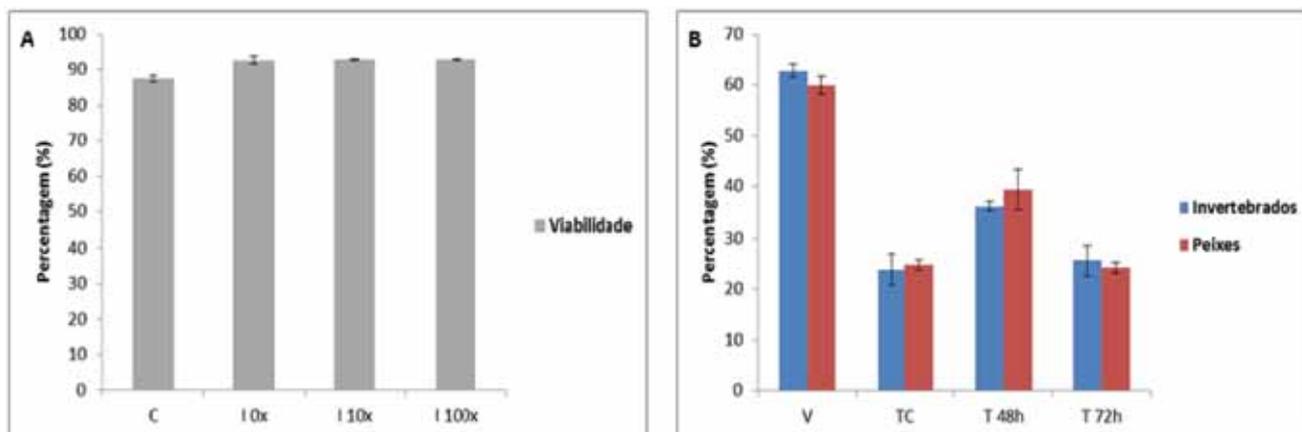


Figura 2 – Avaliação toxicológica dos inibidores seleccionados (A), sendo que C representa as células marcadas com iodeto de propídeo e na presença de Lipofectamina; I representa células marcadas com iodeto de propídeo na presença de Lipofectamina e do inibidor em diferentes diluições (0x, 10x e 100x). Avaliação da eficiência de transfecção na presença dos inibidores (B), onde se representa Viabilidade celular (V), Controlo de transfecção (TC), Transfecção ao fim de 48h (T 48h) e transfecção ao fim de 72h (T 72h).

Dada a complexidade da composição das amostras em estudo, uma avaliação mais rigorosa do efeito inibidor detectado passa por uma análise e caracterização mais profunda do material isolado. Assim, as amostras identificadas como exibindo inibições de interesse (inibição superior a 50% relativamente ao controlo) foram processadas adicionalmente por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC). As diferentes fracções obtidas por este processo foram novamente rastreadas em termos de inibição de DNase I.

Os resultados mostraram que, em geral, o efeito inibidor continuou a ser observado, mas agora em fracções específicas (dados não apresentados). No entanto, em algumas amostras verificou-se que houve diminuição ou aumento do efeito inibidor, o que pode ser devido a um certo efeito sinérgico. A análise deste efeito irá ser aprofundada em estudos posteriores relacionados com o tipo de interacções entre o inibidor e DNase I. Com o intuito de verificar se os inibidores em estudo poderiam melhorar a eficácia de transfecção e/ou conferir um efeito protector ao DNA plasmídico (pVAXGFP, plasmídeo base para vacinas de DNA), procedeu-se à execução de ensaios *in vitro* com células da linha CHO (Chinese Hamster Ovary). Os ensaios envolveram a transfecção das células com o agente transfectante (Lipofectamine 2000™) e coloração com o marcador de viabilidade celular iodeto de propídeo. A avaliação da eficiência de transfecção e a análise da viabilidade celular foram efectuadas por citometria de fluxo, analisando a fluorescência da proteína repórter (Green Fluorescent Protein) codificada no plasmídeo modelo e a fluorescência emitida pelo marcador celular. A descrição detalhada desta análise experimental encontra-se em [10].

Na figura 2A apresentam-se ensaios controlo destinados a verificar qual toxicidade de um dos inibidores seleccionados sobre as células. Avaliou-se o efeito do iodeto de propídeo, da lipofectamina e da presença do inibidor com diferentes diluições. De um modo geral verificou-se que os inibidores são inócuos em termos de toxicidade celular independentemente da espécie de origem e da diluição usada. No caso específico apresentado na figura 2A podemos verificar também que a percentagem de viabilidade é superior na presença do

inibidor quando comparada com os controlos, o que poderá indicar algum efeito de protecção celular.

A figura 2B apresenta resultados de ensaios destinados a verificar o efeito da introdução dos inibidores sobre o processo de transfecção, ou seja se poderiam melhorar a eficácia deste processo e/ou conferir um efeito protector ao DNA plasmídico. Os resultados referem-se a um inibidor isolado de um peixe (P5) e a um inibidor isolado de um invertebrado (I3). Da análise da figura 2B pode-se concluir que a eficiência de transfecção após 48 horas foi maior na presença do inibidor quando comparada com o controlo efectuado na ausência de inibidor e independentemente das espécies. À medida que o tempo de transfecção aumenta verificou-se um decréscimo expectável na eficiência de transfecção, *i.e.* do número de células a expressar GFP. Este efeito deve-se não só à degradação do plasmídeo por nucleases celulares, mas também a um efeito de diluição por divisão celular que causa uma diminuição do número de cópias de plasmídeo/célula.

Embora a expressão do gene de interesse seja o principal objectivo da transfecção, não deverão ser esquecidos os factores de que depende este processo, tais como a internalização, a estabilidade do plasmídeo e a acessibilidade deste ao núcleo e finalmente a eficácia da transcrição e tradução. Relativamente a parâmetros de optimização experimental, também estes devem ter a sua especial atenção dado serem cruciais para a avaliação deste processo, daí a adição da viabilidade, como instrumento auxiliar para a avaliação do processo em estudo. Com base nos resultados promissores obtidos, novos estudos foram iniciados tendo em vista a caracterização dos inibidores marinhos seleccionados em termos da sua natureza molecular e do seu efeito *in vitro* e *in vivo*.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/66326/2009) atribuída a Salomé Magalhães e pelo Research Council of Norway.

Referências

- [1] Abida H, Ruchaud S, Rios L, Humeau A, Probert I, De Vargas C, Bach S, Bowler C (2013) Bioprospecting marine plankton. *Marine Drugs* 11: 4594-4611.
- [2] Burgess JG (2012) New and emerging analytical techniques for marine biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 29-33.
- [3] Murray PM, Moane S, Collins C, Beletskaya T, Thomas OP, Duarte AW, Nobre FS, Owoyemi IO, Pagnocca FC, Sette LD, et al. (2013) Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. *Nature Biotechnology* 30: 839-850.
- [4] Pereira L, Sousa A, Coelho H, Amado AM, Ribeiro-Claro PJ (2003) Use of ftir, ft-raman and ¹³c-nmr spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering* 20: 223-228.
- [5] de Jesus Raposo MF, de Morais, RMSC, de Morais AMMB (2013) Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences* 93: 479-486.
- [6] Dewapriya P, Kim S-K (2014) Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. *Food Research International* 56: 115-125.
- [7] Mayer AM, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts BC, Shuster DE (2010) The odyssey of marine pharmaceuticals: A current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* 31: 255-265.
- [8] Kutzler, M.A.; Weiner, D.B., DNA vaccines: Ready for prime time? *Nat Rev Genet* 2008, 9, 776-788.
- [9] Coban C, Kobiyama K, Aoshi T, Takeshita F, Horii T, Akira S, Ishii KJ (2011) Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity. *Current Gene Therapy* 11: 479-484.
- [10] Magalhães S, Prazeres DMF, Monteiro GA, Nilsen IW (2014). DNase I Inhibition by marine molecules: Application of FRET methodologies (em preparação).



Contact us
Info@stabvida.com
www.stabvida.com

Produção de esqualeno e ácidos gordos polinsaturados por microrganismos do grupo dos Thraustochytrids

Irineu Batista¹, Gabriel Martins², Mária Padilha¹, Maria do Castelo Paulo², Narcisa M. Bandarra¹

¹IPMA, I.P. - Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Departamento do Mar e dos Recursos Marinhos, Divisão de Aquacultura e Valorização, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

²Depsiextracta - Tecnologias e Biológicas, Lda, Zona industrial do Monte da Barca, Lote 62, Rua H, 2100-167 Coruche

Produção de esqualeno e PUFA por via fermentativa

O esqualeno, um triterpeno intermediário na biossíntese de esteróis, apresenta atividade antioxidante e propriedades preventivas de vários tipos de cancro. Ensaios *in vitro* e em modelos animais mostraram que o esqualeno pode inibir os processos tumorais do cólon, pulmões e pele em roedores e é o principal fator responsável pela redução do risco de cancro em comparação com outros ingredientes alimentares usados naqueles ensaios. O esqualeno, na sua forma hidrogenada (esqualano), é muito utilizado em cosmética e também como adjuvante em vacinas. O óleo do fígado de algumas espécies de tubarões de profundidade é a principal fonte de esqualeno. No entanto, estas espécies são muito vulneráveis, havendo várias medidas protecionistas que limitam a pesca destas espécies. Os resíduos da refinação do azeite são outra fonte de esqualeno, mas o desenvolvimento da tecnologia de processamento da azeitona tem levado à progressiva diminuição da quantidade de esqualeno disponível nestes resíduos.

Também os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de cadeia longa da série $\omega 3$ e, em particular, o ácido docosahexaenóico (C22:6, n-3, DHA), têm vindo a merecer um interesse crescente devido aos seus efeitos benéficos para a saúde. Diferentes estudos clínicos e epidemiológicos mostraram que o DHA desempenha um papel importante no desenvolvimento e funcionamento do cérebro, retina e tecidos reprodutores, tanto em adultos como em crianças. Os óleos de peixe são a principal fonte convencional deste ácido gordo, mas as variações sazonais da sua produção e a presença de poluentes limitam a sua utilização em múltiplas aplicações. As limitações, tanto para a obtenção de esqualeno como de PUFA, têm levado à procura de tecnologias de produção à escala industrial e economicamente viáveis para a obtenção destes produtos. Os processos fermentativos têm-se revelado tecnologias muito eficientes para a produção massiva de compostos com atividade biológica. De entre os microrganismos conhecidos que apresentam capacidade para produzir compostos bioactivos, incluindo o esqualeno e o DHA, destacam-se alguns grupos de microalgas [1]. Por outro lado, tem-se dado preferência aos sistemas de produção em con-

dições heterotróficas para obviar os problemas da limitação da luz em sistemas fechados. Porém, apenas algumas estirpes são adequadas para a produção nestas condições. Nestas estirpes inclui-se o grupo dos *thraustochytrids* que crescem naquelas condições e são passíveis de cultivo a grande escala usando tecnologias fermentativas. Os *thraustochytrids* são protistas heterotróficos com uma vasta distribuição geográfica que incluem mangais de zonas subtropicais e águas frias do meio marinho e estuarino. Algumas estirpes de *thraustochytrids* produzem esqualeno e apresentam elevados teores de PUFA, podendo ainda atingir elevadas concentrações de células. Nestas estirpes têm sido identificados vários perfis de PUFA, mas os ácidos gordos dominantes dependem do género e dos habitats dos microrganismos.

Os *thraustochytrids* são igualmente uma fonte de carotenóides como o β -caroteno, a cantaxantina, a astaxantina e a quinenona. Estes compostos, como outros pigmentos, são utilizados em áreas diversificadas como a alimentar, têxtil, farmacêutica, cosmética, dos nutracêuticos e dos corantes de impressão. Além disso, há também um crescente interesse por corantes naturais em virtude dos potenciais efeitos tóxicos de vários pigmentos sintéticos.

Optimização da produção de esqualeno e PUFA por via fermentativa

Vários fatores ambientais e da composição do meio de cultura influenciam o crescimento e a produção de esqualeno e dos ácidos gordos por estirpes do grupo dos *thraustochytrids*. Entre os primeiros factores incluem-se a temperatura, o pH, a velocidade de agitação e o arejamento e nos segundos destacam-se a fonte e quantidade de azoto e carbono, a composição em sais minerais, a limitação de nutrientes, a adição de percursores de ácidos gordos, entre outros. Todavia, as diferentes vias metabólicas do esqualeno, por um lado, e dos ácidos gordos, por outro, apresentam requisitos nutricionais distintos para as respectivas produções. Nesta medida, a otimização das condições de produção destes compostos por estas estirpes tem constituído o objectivo de investigação de diversos grupos. Assim, em estudos com uma estirpe de *thraustochytrids* [2], foi obtida uma relação inversa entre o teor de esqualeno da biomassa, tanto a percentagem de



Figura 1 – Bioreactor de 5 L usado nos ensaios

oxigénio dissolvido como com a temperatura. Verificou-se ainda que a idade da cultura e a temperatura influenciavam a produção de esqualeno.

Outros autores [3] estudaram também o efeito das condições de cultura no crescimento e produção de DHA por *Thraustochytrium aureus*, tendo concluído que uma velocidade baixa de rotação levava a uma diminuição no crescimento e na produção de DHA, o mesmo se verificando para as temperaturas mais baixas. Porém, o teor de lípidos e de DHA era mais elevado na biomassa produzida a temperaturas mais baixas. Por sua vez, os diferentes teores iniciais de glucose não tiveram efeito, nem no teor lipídico nem de DHA, da biomassa obtida. Noutro trabalho [4] verificou-se que as condições ótimas de produção de DHA por *Aurantiochytrium limacinum* eram: 3 % de glucose, 1 % de extrato de levedura e água do mar diluída a 50 %. O rendimento de DHA foi de 4,3 g/L após 26 horas de produção a 28 °C. Chen *et al.* [5] otimizaram a fonte de azoto (glutamato de sódio, triptona e extrato de levedura) para a produção de esqualeno por *Aurantiochytrium sp.* em condições heterotróficas a 25 °C. Verificaram que um meio de cultura com água do mar, com 3 % de glucose, 6,61 g/L de glutamato de sódio, 6,13 g/L de extrato de levedura e 4,50 g/L de triptona permitia obter uma biomassa com um teor de esqualeno de 0,72 mg/g (peso seco) com um rendimento de 5,90 mg/L. Por sua vez, num trabalho [6] com outra estirpe de *Aurantiochytrium* obteve-se uma biomassa com um elevado teor de esqualeno (171 mg/g, p.s.) e rendimento (0,9 g/L), num meio com água do mar diluída a 50 %, 2 % de glucose, 2 % de triptona e 1 % de extrato de levedura, a 25 °C.

A regulação da atividade das enzimas chave envolvidas na biossíntese do esqualeno tem sido outra alternativa seguida para aumentar a produção de esqualeno por estas estirpes. Nesse sentido é de referir um estudo [7] sobre o efeito do jasmonato de metilo na biossíntese de esqualeno por *Schizochytrium mangrovei*. Estes autores verificaram que a adição deste composto permitia aumentar a produção de esqualeno a qual seria devida ao aumento da atividade da esqualeno sintetase. Por outro lado, a fim de promover a acumulação de esqualeno nas células de *A. mangrovei* avaliou-se o efeito do cloreto de terbinafina, um inibidor da monooxigenase do

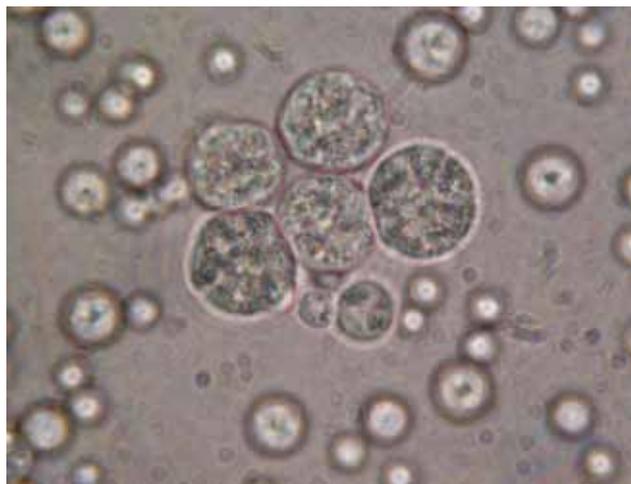


Figura 2 – Aspecto de *Aurantiochytrium sp.* em que estão evidenciados vários esporângios

esqualeno [8]. Estes autores verificaram que este composto provocava alguma inibição do crescimento deste microrganismo, mas um aumento da concentração de esqualeno na biomassa.

Noutra abordagem para otimizar o crescimento de *Schizochytrium spp.* e aumentar a produção de ácidos gordos recorreu-se ao método de pH *auxostat* para manter o teor de NH_3 entre 200 e 300 mg/L [9]. Estes autores obtiveram, após 49 horas, uma produção de biomassa de 63 g/L a partir de uma concentração de glucose 15 %. O teor de lípidos da biomassa era de 25 % com cerca de 38 % de DHA.

No âmbito do projecto ALGAENE (“Microalgas como fonte alternativa para a produção de esqualeno”), financiado pelo QREN, a empresa Depsiextracta e o IPMA desenvolveram o estudo da produção de esqualeno e PUFA por um processo fermentativo heterotrófico usando as estirpes *Thraustochytrium sp.* e *Aurantiochytrium sp.* Nos ensaios realizados num bioreactor com a capacidade de 5 L (Fig. 1) verificou-se que o máximo da produção de esqualeno se registava após 48 a 72 horas de fermentação, enquanto no caso dos PUFA se verificava um aumento gradual até 72 a 96 horas, mantendo-se depois o teor relativamente constante.

Os ácidos gordos polinsaturados eram constituídos fundamentalmente por DHA e DPA n-6 que, em conjunto, representavam cerca de 90 % do total dos PUFA, apresentando o DHA uma percentagem quase duas vezes superior à do DPA n-6.

A maior produção de biomassa, esqualeno e PUFA atingida por *Thraustochytrium sp.* registou-se nos ensaios com água do mar diluída a cerca de 50 %, 3 % de glucose, 0,2 % de extracto de levedura e glutamato de sódio, caudal de ar 3 L/min e 30 °C. A produção de esqualeno e PUFA foi de 418 mg/L e 2590 mg/L, respetivamente.

Em *Aurantiochytrium sp.* (Fig. 2) a maior produção de esqualeno (440 mg/L) foi conseguida num meio de cultura idêntico ao usado em *Thraustochytrium sp.*, mas com 2 % de glucose e a 26 °C. Nestas condições a produção de PUFA foi de 1500 mg/L. Porém, o aumento da temperatura para

30 °C levou a uma diminuição do teor de esqualeno (260 mg/L), mas a um aumento da produção de PUFA que atingiu 2 g/L.

Relativamente aos carotenóides, a sua concentração na biomassa de *Thraustochytrium* sp. diminuiu de 49 mg/100 g para 8,3 mg/100 g quando se usou no meio de cultura água do mar diluída a 50 %.

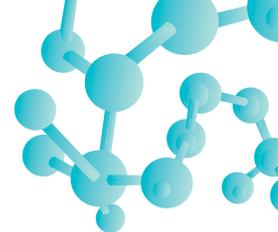
Referências

- [1] Jiang Y, Fan K-W, Wong T-Y, Chen F (2004) Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 1196-1200.
- [2] Lewis TE, Nichols PD, McMeekin TA (2001) Sterol and squalene content of a docosahexaenoic-acid-producing thraustochytrid: Influence of culture age, temperature, and dissolved oxygen. *Marine Biotechnology* 3: 439-447.
- [3] Hur B-K, Cho D-W, Kim H-J, Park CI, Suh H-J (2002) Effect of culture conditions on growth and production of docosahexaenoic acid (DHA) using *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Biotechnology Bioprocess Engineering* 7: 10-15.
- [4] Nagano N, Taoka Y, Honda D, Masahiro HM (2009) Optimization of culture conditions for growth and docosahexaenoic acid production by a marine thraustochytrid, *Aurantiochytrium limacinum* mh0186. *Journal of Oleo Science* 58 (12): 623-628.
- [5] Chen G, Fan KW, Lu FP, Li Q, Aki T, Chen F, Jiang Y (2010) Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. *New Biotechnology* 27 (4): 382-389.
- [6] Nakazawa A, Matsuura H, Kose R, Kato S, Honda D, Inouye I, Kaya K, Watanabe MM (2012) Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production. *Bioresource Technology* 109, 287-291.
- [7] Yue CJ, Jiang Y (2009) Impact of methyl jasmonate on squalene biosynthesis in microalga *Schizochytrium mangrovei*. *Process Biochemistry* 44: 923-927.
- [8] Fan KW, Aki T, Chen F, Jiang Y (2010) Enhanced production of squalene in the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* by medium optimization and treatment with terbinafine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 1303-1309.
- [9] Ganuza E, Anderson AJ, Rattedge C (2008) High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system. *Biotechnology Letters* 30: 1559-1564.



spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Inscreva-se na Sociedade em
www.spbt.pt



Biorremediação de contaminantes em ambientes costeiros e estuarinos

Ana P. Mucha, C. Marisa R. Almeida

Laboratório EcoBioTec (Biorremediação e Funcionalidades dos Ecossistemas), Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR/CIMAR), Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal

Resumo

Foram exploradas as potencialidades dos microorganismos e plantas autóctones para a biorremediação de hidrocarbonetos e metais em ambientes costeiros e estuarinos contaminados. Estes estudos apontam para a necessidade de se delinearem estratégias de remediação direccionadas para cada ecossistema, tendo em conta a suas especificidades em termos de condições ambientais.

Introdução

As zonas costeiras e estuarinas estão sujeitas a grande pressão antropogénica, podendo receber importantes inputs de contaminantes resultantes quer de derrames quer de escurências, quer de descargas de esgotos domésticos e industriais. No entanto estas zonas são ecologicamente muito importantes, com uma grande diversidade de espécies, fornecendo inúmeros serviços ao ser humano. Torna-se pois urgente recuperar estes ecossistemas, e o desenvolvimento de estratégias para limpar estes ecossistemas, a fim de facilitar a sua recuperação, é um tremendo desafio para a comunidade científica mundial.

A biorremediação pode ser considerada uma opção de limpeza eficiente e económica para áreas afectadas por contaminação moderada, apresentando importantes vantagens ambientais, em comparação com alternativas como a lavagem do solo, a incineração ou a eliminação em aterro. Em termos gerais, a biorremediação inclui a utilização de microorganismos ou plantas (fitorremediação) para degradar e/ou remover contaminantes do ambiente. Muitos microorganismos têm capacidade de degradar contaminantes orgânicos, utilizando-os como fonte de carbono ou em cometabolismo. As plantas têm capacidade para remover e acumular metais, podendo ainda ser usadas na promoção de processos microbianos de degradação na vizinhança das suas raízes. A biorremediação com comunidades autóctones apresenta vantagens ambientais sobre a utilização de estirpes ou consórcios provenientes doutros locais ou sobre a utilização de organismos geneticamente modificados.

Diversos trabalhos realizados no laboratório EcoBioTec do CIIMAR têm explorado o potencial dos organismos autóctones para a biorremediação de contaminantes em zonas costeiras e estuarinas, nomeadamente metais e hidrocarbonetos do petróleo. Estes trabalhos passam por uma abordagem em três fases complementares. Inicialmente identificação da presença de organismos com capacidade para degradar/remover determinados contaminantes, seguidamente experiências em microcosmos para avaliar o potencial de degradação

desses organismos e por fim validação e optimização dos processos de degradação/remoção em experiências em mesocosmos em que se simulam condições próximas das ambientais.

Seguidamente apresenta-se resumidamente alguns dos trabalhos efectuados nesta temática.

Biorremediação em praias afectadas por derrames de petróleo

Para a recuperação de praias afectadas por derrames de petróleo, foi inicialmente avaliado o potencial de biorremediação de microorganismos de sedimentos intertidais de uma praia afetada em 2002 pelo derrame do petroleiro Prestige, e sujeita a contaminação crónica por petróleo desde então. Para tal, a resposta de microorganismos a uma nova contaminação com petróleo foi avaliada em condições controladas de laboratório em termos de estrutura da comunidade, abundância e capacidade para degradar hidrocarbonetos. Os microorganismos autóctones foram capazes de responder à nova contaminação, aumentando a sua abundância e alterando a estrutura da comunidade. Esta resposta foi particularmente clara para alguns grupos de bactérias específicas, tais como *Pseudomonas*, *Actinomycetales* e *Betaproteobacteria*, as quais apresentaram um importante potencial para a degradação de hidrocarbonetos (até 85 % de degradação de hidrocarbonetos), sendo a biodegradação estimulada pela adição de uma quantidade adequada de azoto [1].

Posteriormente foi investigado o potencial das comunidades microbianas presentes nos sedimentos intertidais de uma praia não impactada (praia não afectada por nenhum derrame de petróleo significativo) para degradar hidrocarbonetos. Em condições controladas de laboratório, três tratamentos de biorremediação foram testadas, bioestimulação (adição de nutrientes), bioaumento (adição de um consórcio microbiano com capacidade para degradar petróleo, produzido a partir da comunidade autóctone) e tratamento combinado de bioestimulação + bioaumento, e os resultados comparados com atenuação natural (Fig. 1). Os resultados demonstraram



Figura 1 – Aspecto visual da degradação do petróleo após 15 dias de incubação em água do mar. Frascos nº 19: atenuação natural; 22: bioestimulação; 25: bioaumento; 28: bioestimulação + bioaumento.

que a comunidade microbiana desta praia não impactada poderia responder a um derrame de petróleo, degradando hidrocarbonetos. Mas, para aumentar o ritmo da atenuação natural, o tratamento combinado de bioestimulação + bioaumento seria a abordagem mais adequada. Os consórcios microbianos autóctones poderiam ser obtidos “antes” ou “depois” da contaminação, devendo ser inoculados no local logo após o derrame [2].

A aplicação da biorremediação para remoção de petróleo enterrado na zona intertidal de praias afectadas por derrames foi seguidamente avaliada usando um sistema projetado especificamente para esse fim. Para tal, uma camada de areia contaminada artificialmente foi enterrada numa coluna de areia, sendo submetida a simulação de maré (Fig. 2). O efeito do bioaumento foi evidente após 60 dias (80% de degradação de hidrocarbonetos), sendo o efeito do bioestímulo só observado passados 120 dias. Os microrganismos e os nutrientes adicionados no topo da coluna de areia foram capazes de atingir a camada de petróleo enterrado acelerando o processo de remoção. Assim, o bioaumento com consórcio microbiano autóctone e com as condições nutritivas adequadas resultou numa degradação mais rápida, surgindo assim como uma metodologia de baixo custo para remediação de petróleo enterrado e contribuindo para a recuperação de praias afectadas por derrames [3].

Biorremediação e fitorremediação de hidrocarbonetos e metais em estuários

Com o objectivo avaliar a influência da associação planta-microrganismos na degradação de hidrocarbonetos de petróleo em sapais de um estuário temperado (Rio Lima, NW Portugal), foram efectuadas amostragens sazonais durante um ano abrangendo sedimentos colonizados por diferentes plantas (*Juncus maritimus*, *Phragmites australis*, *Triglochin stricta* e *Spartina patens*). Os resultados demonstraram que as quatro plantas de sapal podem influenciar as comunidades microbianas, promovendo o desenvolvimento da população de degradadoras de hidrocarbonetos [4]. Este efeito variou em função da espécie de planta, do seu ciclo fenológico [5] e das características dos sedimentos colonizados [6].

Experiências em laboratório vieram confirmar o potencial dos microrganismos associados a plantas de sapal para de-

gradarem hidrocarbonetos do petróleo, tendo-se obtido, em 15 dias, percentagens de degradação entre os 15 e os 41%, dependendo do tipo de sedimento, da espécie de planta e das condições nutricionais. Todas as comunidades microbianas responderam à contaminação com petróleo com um aumento na sua abundância, alteração da sua estrutura genética e diminuição na diversidade [7].

Posteriormente foram montadas experiências em estufas, com sistemas de mesocosmos em que se simularam as condições ambientais de um estuário, incluindo os ciclos de maré, para investigar a degradação de hidrocarbonetos de petróleo em sedimentos de sapal. A eficiência de dois tratamentos de biorremediação, bioestimulação e bioaumento, foi testada em comparação com a atenuação natural de hidrocarbonetos em sedimentos colonizados (*J. maritimus* e *P. australis*) e não colonizados. Durante estes estudos, a degradação de hidrocarbonetos em sedimentos não colonizados foi insignificante independentemente dos tratamentos. Porém, a presença de plantas aumentou a degradação de hidrocarbonetos até 16%, apontando para a disponibilidade de oxigénio como a limitação mais importante neste tipo de sedimentos. No entanto, nenhum dos tratamentos (bioestímulo ou bioaumento) aumentou a degradação de hidrocarbonetos, e, em alguns casos, mostrou mesmo um efeito negativo, uma vez que o excesso de nutrientes pode diminuir a biomassa das raízes das plantas diminuindo o transporte de oxigénio para os sedimentos, facto que deve ser tido em conta na concepção de estratégias de limpeza [8].

Relativamente aos metais, foi inicialmente avaliado o papel das diferentes plantas de sapal mencionadas acima na distribuição e retenção de metais em ambientes estuarinos. Todas as plantas estudadas demonstraram capacidade para acumular metais, embora a forma como estes se distribuíram nos vários tecidos (raízes, rizomas, caules e folhas) tenha variado de metal para metal e em função das espécies e do sedimento por elas colonizado [9].

Esta capacidade de fitorremediação de metais, nomeadamente cádmio, foi confirmada em experiências em estufas, com sistemas de mesocosmos que simulam as condições ambientais de um estuário [10]. Nestas experiências foi ainda possível demonstrar a potencialidade da técnica de bioaumento autóctone no incremento da capacidade de fitorremediação das plantas de sapal. Para tal foram desenvolvidos consórcios microbianos resistentes a Cd, seleccionados a partir das comunidades autóctones. A adição destes consórcios permitiu aumentar a capacidade das plantas para fitoestabilização (acumulação de metal na zona das raízes) ou fitoextração (translocação do metal para os tecidos superiores), dependendo da espécie de planta [11].

Conclusão

Estes trabalhos demonstraram a potencialidade dos microrganismos e plantas autóctones para a biorremediação/fitorremediação de hidrocarbonetos e/ou metais em ambientes costeiros e estuarinos contaminados. Estes estudos apontam ainda para a necessidade de se delinarem estratégias de re-



Figura 2 – Sistema de mesocosmos para simulação de processos de biorremediação de petróleo enterrado em colunas de areia sujeitas a ciclos de marés de 12/12 horas.

mediação direccionadas para cada ecossistema, tendo em conta a suas especificidades em termos de condições ambientais. Constituem assim um importante contributo para futuras estratégias de protecção e recuperação de ambientes costeiros e estuarinos.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto PESt-C/MAR/LA0015/2011 e do projecto PTDC/MAR/099140/2008.

Referências

- [1] Reis I, Almeida CMR, Magalhães CM, Cochofel J, Guedes P, Basto MC, Bordalo AA, Mucha AP (2014) Bioremediation potential of microorganisms from a beach affected by the Prestige oil spill (NW Spain). *Environmental Science and Pollution Research* 21: 3634-3645.
- [2] Almeida CMR, Reis I, Couto N, Bordalo AA, Mucha AP (2013) Potential of the microbial community present in an un-impacted beach sediment to remediate petroleum hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 3176-3184.
- [3] Pontes J, Mucha AP, Santos H, Reis I, Bordalo A, Basto MC, Bernabeu A, Almeida CMR (2013) Potential of bioremediation for buried oil removal in beaches after an oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 76: 258-265.
- [4] Ribeiro H, Mucha AP, Almeida CM, Bordalo A (2011) Hydrocarbon degradation potential of salt marsh plant microorganisms associations. *Biodegradation* 22:729-739.
- [5] Ribeiro H, Mucha AP, Almeida CM, Bordalo AA (2013) Influence of different salt marsh plants on hydrocarbon degrading microorganisms abundance throughout a phenological cycle. *International Journal of Phytoremediation* 15:715-728.
- [6] Ribeiro H, Almeida CM, Mucha AP, Teixeira C, Bordalo AA (2013) Influence of natural rhizosediments characteristics on hydrocarbons degradation potential of microorganisms associated to *Juncus maritimus* roots. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84: 86-96.
- [7] Ribeiro H, Mucha AP, Almeida CMR, Bordalo AA (2013) Bacterial community response to petroleum contamination and nutrient addition in sediments from a temperate salt marsh. *Science of the Total Environment* 458-460: 568-576.
- [8] Ribeiro H, Mucha AP, Almeida CMR, Bordalo AA (2014) Salt marsh plants potential to remove petroleum hydrocarbon: rhizoremediation, biostimulation or bioaugmentation? *Journal of Environmental Management* 137: 10-15.
- [9] Almeida CMR, Mucha AP, Vasconcelos MTSD (2011) Role of different salt marsh plants on metal retention in an urban estuary (Lima estuary, NW Portugal). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 91: 243-249.
- [10] Nunes da Silva M, Mucha AP, Rocha AC, Silva C, Carliá C, Gomes CR, Almeida CMR (2014) Evaluation of the ability of two plants for the phytoremediation of Cd in salt marshes. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 141: 78-84.
- [11] Nunes da Silva M, Mucha AP, Rocha AC, Teixeira C, Gomes CR, Almeida CMR (2014) A strategy to potentiate Cd phytoremediation by saltmarsh plants - autochthonous bioaugmentation. *Journal of Environmental Management* 134: 136-144.

A ponte entre a escola e a ciência azul

Costa, R. L.¹, Gerales, D.², equipa IPMA³, equipa EMEPC⁴

¹Estrutura de missão para a extensão da plataforma continental

²Instituto Português do Mar e da Atmosfera

³Equipa de Investigadores integrantes do projecto

⁴Equipa do projeto Kit do Mar

Resumo

“A Ponte Entre a Escola e a Ciência Azul” é um projeto-piloto financiado pelo programa “Escolher ciência” coordenado pela Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental em parceria com Instituto Português do Mar e da Atmosfera, cujo principal objetivo é a integração ativa de estudantes do ensino secundário em contextos de investigação autênticos. Através da criação de parcerias entre escolas com ensino secundário e equipas de investigação do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, permite-se que jovens entre os 15 e os 18 anos realizem trabalhos de investigação científica na área do mar, orientados por cientistas nos seus contextos profissionais.

Introdução

A aprendizagem das ciências no ensino básico e secundário nos dias de hoje deve centrar-se em pressupostos que implicam o desenvolvimento de competências que extravasam a simples aquisição de conceitos e conhecimentos científicos. Alguns estudos europeus [1-5] recomendam que a educação em ciência na Europa deveria educar os alunos com o conhecimento sobre o mundo que a ciência fornece e explicar o funcionamento dos procedimentos científicos; esclarecer os alunos sobre as carreiras na área de ciências, explicando-lhes a importância da ciência para a atividade humana; criar ambientes de aprendizagem que envolvam os alunos em atividades investigativas, ou sobre a natureza da ciência; promover ações colaborativas de partilha de através de cooperação à escala nacional e europeia; desenvolver competências pessoais relacionadas com a criatividade e a iniciativa e promover competências de comunicação oral, escrita e simbólica nos alunos para melhor exprimirem ideias científicas.

Apesar destas recomendações e após o estudo do projeto “Sails” verificou-se alguns problemas no ensino das ciências em Portugal. A ausência ou insuficiência de tarefas de natureza investigativa na maioria das aulas de ciências, a preferência do uso do manual escolar e de livros de exercícios, a fraca exploração da relação entre a ciência – tecnologia – sociedade, o ensino muito centrado no professor quando os agentes principais deveriam ser os alunos e as competências investigativas como a planificação, a interpretação de experiências, a comunicação de dados científicos entre outras ainda não são devidamente parametrizados na avaliação das disciplinas de natureza científica.

Com base nestes estudos internacionais e nacionais acerca de didática das ciências e da filosofia da ciência, a Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental em parceria com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera, financiados pelo Projeto “Escolher Ciência” da Agência Ci-

ência Viva, criaram o Projeto “A Ponte entre a Escola e a Ciência Azul” que tem como principal objetivo a integração ativa de estudantes do ensino secundário em contextos de investigação autênticos. Com este intuito foram criadas parcerias entre escolas e equipas de investigação do Instituto Português do Mar e da Atmosfera para permitir que jovens entre os 15 e os 18 anos realizem trabalhos de investigação científica na área do mar, orientados por cientistas nos seus contextos profissionais.

As diferentes estratégias de ensino-aprendizagem que procurámos desenvolver em sala de aula [6], bem como a imersão dos alunos do ensino secundário em contextos reais de ciência, permitem, na nossa opinião, melhorar não só as conceções dos alunos em relação à natureza da ciência e da investigação científica, bem como colmatar algumas lacunas no ensino formal das ciências, deficitária na utilização de estratégias de ensino baseadas em trabalho prático, laboratorial e investigativo [7].

O projeto decorreu durante um ano letivo e dividiu-se em três fases:

1ª fase

Nesta primeira fase procurámos, em contexto de sala de aula, apoiar a preparação das atividades de laboratório que viriam a decorrer na segunda fase (segundo período). Estas atividades foram divididas em dois workshops (podem ser consultados em <http://imgs.sapo.pt/kitdomar/content/files/comocriarprojcientifico.pdf> e http://imgs.sapo.pt/kitdomar/content/files/como_ler_artigos_cientificos.pdf):

1 – Como criar um projeto de investigação (Fig. 1)

2 – Como ler artigos científicos

A importância deste apoio justifica-se na medida em que o ensino das ciências deve contemplar as várias etapas inerentes a uma investigação científica, que incluem as conce-



Figura 1 – Workshop 1 - Como criar um projeto de investigação

ções acerca da natureza da ciência e da própria investigação científica.

Foram desenvolvidas estratégias de ensino diversificadas (atividades de pesquisa e discussão em ambiente colaborativo) que permitiram aos alunos:

- Compreender como a ciência se constrói através dos métodos científicos;
- Aprender a fazer uma pesquisa bibliográfica: conhecer o “estado da arte”, os métodos para estudar o problema e os resultados que se podem obter;
- Aprender a ler e discutir artigos científicos;
- Formular um problema de investigação;
- Estabelecer um protocolo científico;
- Aprender o que são as variáveis de uma experiência;
- Controles, réplicas, variáveis e a sua importância em investigação.

2ª fase

Esta fase corresponde à realização das investigações em laboratório. Os alunos participantes foram divididos por vários grupos de investigação nos laboratórios do IPMA Algarve e IPMA Algués (Fig. 2) onde trabalharam diversos temas como:

- Biologia do Crescimento e Reprodução (Investigadores responsáveis: Ana Maria Costa, Cristina Nunes, Eduardo Soares e Maria Manuel Martins);
- Parasitas em Peixes e Moluscos Bivalves (Investigadores responsáveis: Paula Ramos e Francisco Ruano);
- Aquicultura: produção artificial de bivalves (Investigadores responsáveis: Domitília Matias, Sandra Joaquim, Alexandra Leitão e Frederico Batista);
- Bem-estar animal: identificação de parasitas e avaliação de parâmetros sanguíneos (Investigadores responsáveis: Laura Ribeiro e Florbela Soares);

- Desenvolvimento larvar: Relações biométricas como indicadores da qualidade larvar (Investigadores responsáveis: Emília Cunha);

- Identificação de unidades sedimentares em sondagens marinhas (Investigadora responsável: Teresa Drago).

Todos os trabalhos realizados foram articulados com os currículos do ensino secundário nas disciplinas de biologia e geologia, sendo que os objetivos pedagógicos que se pretendiam alcançar foram:

- Familiarização com as metodologias utilizadas no estudo do passado geológico da Terra;
- Perceção da constante mudança da Terra, em particular das alterações climáticas;
- Melhoria das noções dos alunos acerca da natureza da ciência e da investigação científica;
- Interpretação de informação através de modelos teóricos existentes na bibliografia, que permitam atribuir sentido aos dados recolhidos;
- Análise de informação e realização de inferências;
- Aproximação dos alunos ao ambiente científico e à investigação aplicada;
- Melhoria das noções dos alunos acerca da atividade de produção animal;
- Proporcionar o contacto com metodologias (experimentais e analíticas) no estudo de parasitas de espécies marinhas, no estudo da reprodução e desenvolvimento de moluscos;
- Fomentar a noção do bem-estar animal e a sua importância na qualidade do produto;
- Compreender a aplicabilidade da ciência e da investigação científica, no sector privado;
- Tomada de consciência das relações entre ciência-tecnologia-sociedade-ambiente (CTSA) através de exemplos concretos explorados pelos alunos;



Figura 2 – Trabalho de investigação dos alunos nos laboratórios do IPMA

- Consolidação de conteúdos programáticos através de observação direta;
- Aprender a reconhecer macroscopicamente os parasitas potencialmente patogénicos para o homem, adquirindo competências enquanto consumidores informados e conscientes;
- Compreender a aplicabilidade da ciência e da investigação científica, nomeadamente na indústria de transformação dos produtos da pesca.

3ª fase

O ano letivo terminou com a escrita de um artigo/poster de carácter científico por parte dos alunos e a sua apresentação no congresso científico “A Ponte entre a Escola e a Ciência Azul”.

Durante esta fase os alunos analisaram e discutiram os resultados obtidos, formularam conclusões, previram hipóteses de trabalho futuro, escreveram um artigo ou poster científico e apresentaram o seu trabalho no congresso. A equipa Kit do Mar e os investigadores apoiaram os alunos em sala de aula e através de plataformas virtuais (ver por exemplo http://imgs.sapo.pt/kitdomar/content/files/como_escrever_artigos_cientificos.pdf) recorrendo a estratégias de ensino diversificadas (atividades de discussão e pesquisa, sempre em ambiente colaborativo).

Esta última fase do projeto permitiu fomentar o trabalho colaborativo entre os alunos, assim como desenvolver competências de comunicação oral, escrita e de argumentação e estimular o raciocínio lógico, a inferência e a interpretação de dados, permitiu também a partilha de conhecimento científico entre investigadores e alunos. O uso de uma linguagem científica e rigorosa foi também estimulado nos alunos nesta fase. Através da preparação e da participação dos alunos no congresso os alunos perceberam como a ciência se comunica e se partilha.

Conclusão

A realização deste projeto veio tentar colmatar algumas das lacunas encontradas no ensino das ciências em Portugal (nomeadamente no que diz respeito à implementação de atividades investigativas e a noções mais corretas acerca da natureza da ciência). Contribuiu para melhorar os níveis de literacia científica (especialmente das ciências do mar) dos alunos participantes. Acreditamos que ajudou os alunos na tomada de decisão aquando da escolha de carreiras científicas ao nível da sua formação académica, contribuiu para melhorar a visão da ciência como uma disciplina mais popular e relevante aos olhos dos alunos, divulgou algum do trabalho científico nacional e que destacou a ciência como área do conhecimento que possibilita um desenvolvimento sustentável da sociedade e possibilita o entendimento do mundo que nos rodeia.

Foram desenvolvidos vários recursos educativos resultantes da nossa análise e experiência, que se encontram disponíveis on-line para que professores de ciências possam usar estratégias diferentes em sala de aula de forma autónoma.

Esperamos que este projeto seja de agora em diante, implementado em parceria com mais instituições de carácter científico, como centros de investigação, institutos, faculdades, para que mais alunos do ensino secundário possam usufruir de um contacto próximo com a ciência que se faz em Portugal, nomeadamente na área do mar.

Referências

- [1] Osborne J (2008) Science education in Europe: critical reflections: a report to the Nuffield Foundation. London: Nuffield Foundation.
- [2] Rocard et al. (2007) Science education now: a renewed pedagogy for the future of Europe. Luxembourg: EUR-OP.
- [3] AAAS (1989). Project 2016: Science for all Americans. Washinton D.C.
- [4] NRC (1996). National Science Standards. Washington, National Academy Press.
- [5] NRC (2000). Inquiry and the National Science Education Standards National Science Standards. Washington, National Academy Press.
- [6] Bybee R, et al. (2006). BSCS 5E Instructional Model: Origins and effectiveness.
- [7] IAP (2011). The global network of science academies.

Ficha Técnica

Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia
Publicação Quadrimestral . Série 2 - Número 5
Junho 2014

Propriedade

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Direcção

Presidente - José António Teixeira
Vice-Presidente - Maria Raquel Aires Barros
Secretário Geral - Eugénio Campos Ferreira
Tesoureiro - Manuel Coimbra da Silva
Vogal - Timothy Alun Hogg

Editores

José António Teixeira
Maria Raquel Aires Barros
Lígia O. Martins
Jorge H. Leitão

Paginação e Design

Dossier Comunicação e Imagem

Execução gráfica

Dossier Comunicação e Imagem
Tiragem - 1000 exemplares
Depósito Legal - 187836/02
ISSN - 1645-5878

Sócios Colectivos da SPBT

Amersham Bioscience Europe GmbH
Instituto Piaget

FIPA – Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares
APIM – Associação Portuguesa da Indústria de Moagem e Massas
PROENOL – Indústria Biotecnológica, Lda.
PACI – Material Científico e Industrial, S.A.
VWR International – Material de Laboratório, S.A.
Laboratórios BIAL – Portela & Companhia, S.A.
INETI – Instituto de Engenharia e Tecnologia Industrial
CIPAN – Companhia Produtora de Antibióticos, S.A.
IZASA Portugal Distribuições Técnicas, Lda.
PIONEER HI-BRED Sementes de Portugal, S.A.
Escola Superior de Biotecnologia
RAR – Refinarias de Açúcar Reunidas, S.A.
Bayer Cropscience (Portugal) – Produtos para a Agricultura, Lda.
IBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica



Imagem de capa - Praia da Costa Vicentina (Almogrove) onde é comum encontrar macroalgas com bioatividades de interesse biotecnológico.

Da página 8, "Os oceanos e a biotecnologia marinha: um novo desafio para Portugal" João Varela, Hugo Pereira, Eunice Santos, Ivo Monteiro, Cheila Tocha, Luísa Custódio, Luísa Barreira, MarBiotech, CCMAR.



**Sociedade Portuguesa
de Biotecnologia**

Universidade do Minho
Departamento de Engenharia Biológica
4700-057 Braga
PORTUGAL

www.spbt.pt