

BOLETIM

**spbt**  
sociedade  
portuguesa de  
biotecnologia

# biotecnologia

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

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



**Biotecnologia 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 suas amostras, a um preço mais económico.



[www.eppendorf.com/freezers](http://www.eppendorf.com/freezers)

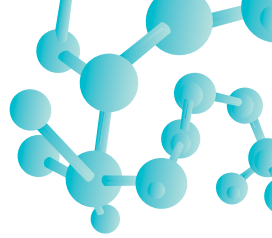
### Contactos:

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

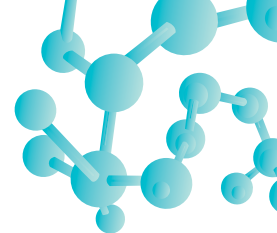
**José Teixeira**  
(Presidente da SPBT)

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



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

E. D. Xavier<sup>1</sup>, J. Furnas<sup>2</sup>, J. M. Azevedo<sup>1</sup>, A. Reis<sup>3</sup>, L. Teves<sup>2</sup>, G. Mota<sup>2</sup>, A. I. Neto<sup>1,4</sup>

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

<sup>2</sup>ALGICEL – Biotecnologia e Investigação, Ponta Delgada, Portugal

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

<sup>4</sup>CIIMAR – 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-

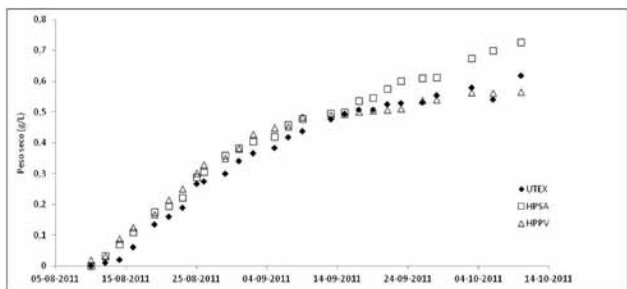


Figura 1 – Curvas de crescimento de duas estirpes locais de *H. pluvialis* (HPSA e HPPV) e uma não local (UTEX).

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

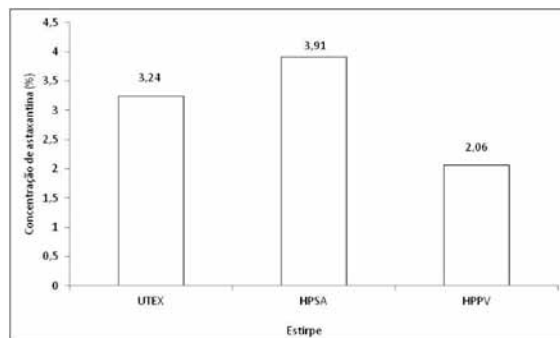


Figura 2 – Concentração de astaxantina em biomassa seca de duas estirpes locais de *H. pluvialis* (HPSA e HPPV) e uma não local (UTEX).

ausência de agitação constante da cultura e injeção de CO<sub>2</sub>. 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.

## 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  
Lúcia 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](http://www.spbt.pt)