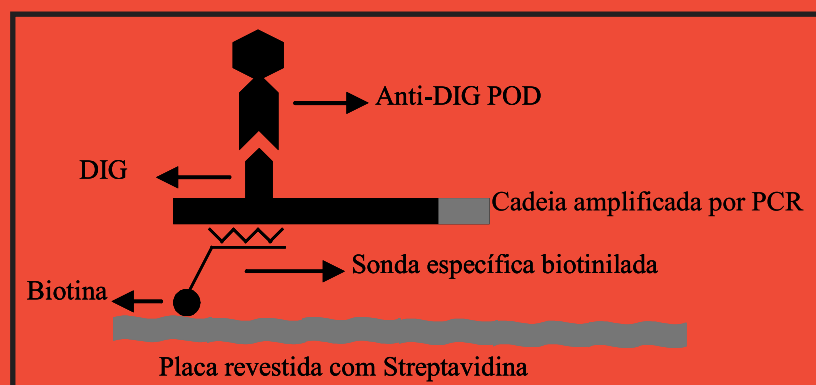
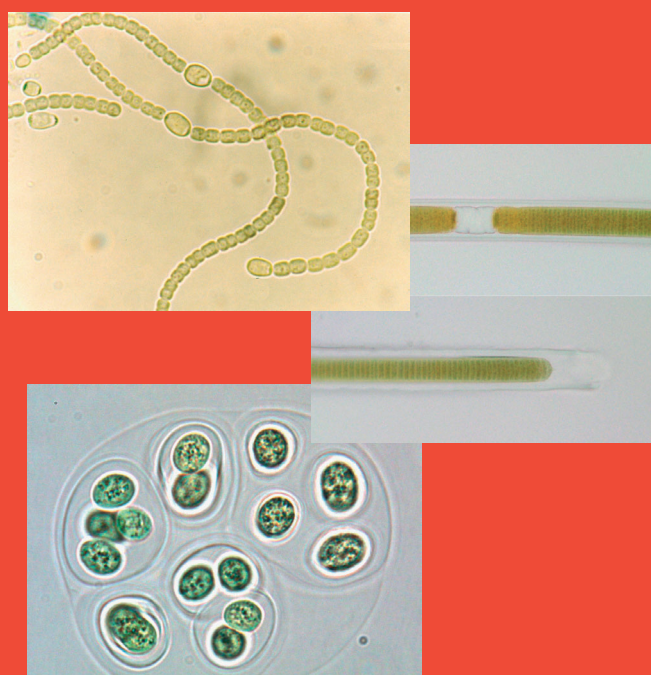




Boletim de Biotecnologia

Nº 75 Agosto 2003



Energias renováveis e limpas de origem Biológica

Biohidrogénio: produção de H₂ utilizando cianobactérias

Biotecnologia molecular e métodos de diagnóstico

Perkinsus atlanticus – Desenvolvimento de um método de diagnóstico para detecção da infecção em moluscos bivalves

Bioempresas em Portugal

Biotechnology in Portugal: promoting downstream private initiative and foreign investment should be the next priorities

STAB VIDA – Uma Empresa Portuguesa de Investigação e Serviços em Biologia Molecular e Biotecnologia

Bionotícias

BIOTEC 2003 - X Congresso Nacional de Biotecnologia

Mensagem da nova Direcção da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia



Boletim de Biotecnologia

BOLETIM DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE BIOTECNOLOGIA

Propriedade de:
Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Publicação Quadrimestral
Nº 75 - Agosto 2003

Directora

Isabel Sá Correia

Director-Adjunto

José Cardoso de Menezes

Composição de textos e paginação

Bruno Miguel Afonso

Execução Gráfica

Gráfica Povoense Lda.
R. Primeiro de Dezembro, 40 A e B
PÓVOA DE SANTA IRIA

Tiragem: 1000 exemplares

Distribuição gratuita aos sócios da SPBT

As colaborações assinadas são da exclusiva
responsabilidade dos seus autores

Publicação Subsidiada pela Fundação
para a Ciência e a Tecnologia, com
o Apoio do Programa Operacional
Ciência, Tecnologia, Inovação do Quadro
Comunitário de Apoio III

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E DO ENSINO SUPERIOR Portugal

1 Índice

2 Editorial

Mensagem da nova Direcção da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

3 Energias renováveis e limpas de origem biológica

Biohidrogénio: produção de H₂ utilizando cianobactérias

Paula Tamagnini, Elsa Leitão, Paulo Oliveira

8 Biotecnologia molecular e métodos de diagnóstico

Perkinsus atlanticus – Desenvolvimento de um método de diagnóstico para detecção da infecção em moluscos bivalves

Leite, R.M., Rodrigues, P.M., Elandalloussi, L.M., Afonso, R.M., Nunes, P.A. and Cancela, M.L.

12 Bionotícias

BIOTEC 2003 - X Congresso Nacional de Biotecnologia

14 Bioempresas em Portugal

Biotechnology in Portugal: promoting downstream private initiative and foreign investment should be the next priorities

Pedro de Noronha Pissarra

19 Bioempresas em Portugal

STAB VIDA – Uma Empresa Portuguesa de Investigação e Serviços em Biologia Molecular e Biotecnologia

Sofia Goes, Orfeu Flores

Na Capa: À esquerda, imagens de cianobactérias ao microscópio óptico; direita, esquema do ensaio PCR-ELISA para detecção de *Perkinsus atlanticus* em moluscos bivalves.

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia *on-line* em:

<http://www.spbt.pt>

Boletim de Biotecnologia *on-line* em:

<http://dequim.ist.utl.pt/BBio>

Editorial

No passado dia 15 de Março, teve lugar a Assembleia Geral da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, a qual tinha capacidade eleitoral relativamente aos órgãos sociais para o triénio 2003-2005. Ao sufrágio submeteu-se uma única lista candidata – que teve a honra de encabeçar – constituída por onze elementos no total, cuja escolha pretendeu constituir-se como solução de compromisso entre representatividade geográfica (6 elementos da Região Norte, 1 da Região Centro, 3 da Região de Lisboa e Vale do Tejo, e 1 da Região Sul), representatividade institucional (4 elementos da Escola Superior de Biotecnologia, 2 da Universidade do Minho, 1 da Universidade de Aveiro, 1 do Instituto Superior Técnico, 1 do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, e 2 de startups com intervenção activa em temáticas biotecnológicas – NECTON e STAB), e representatividade por temática de intervenção (3 elementos da área de alimentos, 3 de ambiente, 2 de microbiologia, 2 de biologia molecular e engenharia metabólica, e 1 de química fina). A lista recolheu a unanimidade dos votos validamente expressos. Sob a égide desse mandato explícito, perspectiva-se um bom equilíbrio nas decisões e uma grande robustez nas orientações, que se pretende venham a fortalecer o papel da Sociedade como órgão de cúpula da intervenção biotecnológica em Portugal, assim como potenciar de modo integral a fileira da biotecnologia, desde a investigação fundamental até às aplicações comerciais, passando pela investigação aplicada, o desenvolvimento experimental e a transferência de tecnologia.

Como primeira incumbência, a actual Direcção despoletou de imediato a preparação do X Congresso Nacional de Biotecnologia – BIOTEC'2003. Tal congresso, a realizar de 6 a 8 de Dezembro nas instalações do ex-IPIMAR em Algés (Lisboa), visa constituir uma oportunidade única para a interacção entre investigadores, estudantes e empresários, cujas actividades se cruzam com as múltiplas vertentes da Biotecnologia. Pretendendo ser um fórum preferencial para divulgação e discussão alargadas sobre a investigação e a aplicação da biotecnologia na actualidade – em especial no nosso país, e seguindo uma abordagem pluridisciplinar, o BIOTEC'2003 está estruturado em cinco grandes áreas temáticas complementares, a saber: biotecnologia e alimentos, biotecnologia e ambiente, biotecnologia e indústria, biotecnologia e saúde, e biotecnologia e sociedade.

Contamos com a sua adesão a esta iniciativa, que visa recuperar a tradição de um congresso nacional de Biotecnologia realizado numa base bi-anual – para mais informações, sugiro a consulta do endereço url: www.esb.ucp.pt/biotec2003.

F. Xavier Malcata

Presidente da Direcção da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Biohidrogénio: produção de H₂ utilizando cianobactérias

Paula Tamagnini^{1,2}, Elsa Leitão¹, Paulo Oliveira^{1,2}

¹Instituto de Biologia Molecular e Celular, Unidade de Microbiologia Celular e Aplicada, Universidade do Porto, R. Do Campo Alegre, 823, 4150-180 Porto
Tel. 22 6074900, Fax 22 6099154, Email pmtamagn@ibmc.up.pt

²Faculdade de Ciências, Departamento de Botânica, Universidade do Porto, R. Do Campo Alegre, 1191, 4150-181 Porto

Introdução

A revolução industrial e a utilização intensiva dos combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural) estão associadas ao elevado nível de vida das sociedades ocidentais. Contudo, as reservas de combustível fóssil não são ilimitadas e a sua utilização tem impactos ambientais consideráveis como, por exemplo, o aumento do efeito estufa e as consequentes alterações do clima. Actualmente, enfrentamos um novo desafio em termos energéticos, que se traduz por uma transição para fontes de energia renováveis e menos poluentes. Neste contexto, o hidrogénio (H₂) surge como uma alternativa válida dado que é o elemento mais abundante no Universo e a sua combustão directa produz uma quantidade significativa de energia, e liberta apenas água. Nos últimos anos, as várias técnicas de produção de hidrogénio têm suscitado o interesse da comunidade científica e da indústria de combustíveis e de transportes. Enquanto cientistas e técnicos aperfeiçoam diferentes métodos de produção, armazenamento e transporte do hidrogénio, a indústria testa protótipos que o utilizam como combustível.

Métodos de Produção de H₂

O H₂ pode ser produzido recorrendo a vários métodos: (1) produção a partir de combustíveis fósseis e de biomassa agrícola ou florestal, (2) produção a partir da água por métodos “não-biológicos” (processos térmicos, termoquímicos, electrólise ou fotoelectrólise da água), (3) produção biológica de hidrogénio (produção de H₂ através da fermentação de compostos orgânicos ou fotoprodução de H₂ por microrganismos).

Os métodos que usam combustíveis fósseis ou biomassa agrícola e florestal ainda são praticados devido à disponibilidade e baixos custos das matérias primas, apesar de envolverem fontes não-renováveis e técnicas relativamente dispendiosas e poluentes. Actualmente, a fotoelectrólise da água em H₂ e O₂, por processos fotovoltaicos, é a alternativa mais eficaz e economicamente mais viável. Contudo, a produção de H₂ recorrendo a microrganismos fotossintéticos surge como uma opção válida e é também um desafio atractivo uma vez que as baixas eficiências de conversão da energia solar exigem um esforço de optimização.

No caso da produção de biohidrogénio por fermentação, o H₂ é libertado pela acção de hidrogenases como meio de eliminar o excesso de electrões gerados durante a degradação de hidratos de carbono. A produção fotobiológica de hidrogénio pode ser realizada por bactérias fotossintéticas, cianobactérias e algas, utilizando a radiação solar para converter H₂O, compostos de enxofre ou compostos orgânicos, em hidrogénio. As cianobactérias encontram-se entre os candidatos ideais uma vez que têm os requisitos nutricionais mais simples: crescem em meios contendo sais minerais simples, utilizam o N₂ e CO₂ atmosféricos como fontes de azoto e carbono, a água como fonte de electrões e poder redutor, e a luz solar como fonte de energia (Benemann, 1996/1997). Por este motivo, o seu cultivo revela-se relativamente simples e pouco dispendioso.

Aplicações práticas

Entre as múltiplas aplicações práticas do H₂ como fonte de energia/combustível, destaca-se a indústria automóvel. Várias empresas deste ramo, como por exemplo a Opel e a Daimler-Chrysler, têm desenvolvido protótipos cuja força motriz está dependente de uma pilha a H₂. Esta produz electricidade através da reacção do O₂ atmosférico com o H₂ armazenado no depósito, operando como uma bateria que não necessita de ser recarregada. O desenvolvimento destes protótipos tem permitido atingir níveis de sucesso suficientemente encorajadores. No caso do Hydrogen3 da Opel baseado no modelo Zafira, a velocidade máxima atingida ronda os 150 km/h e apresenta uma autonomia de 400 km, sem necessidade de re-abastecimento do reservatório de H₂. Em alguns países, como é o caso da Islândia, já circula uma rede de autocarros que usa esta tecnologia. Também no Porto, e em paralelo com outras cidades europeias, vão começar a circular alguns autocarros a H₂. O sistema parece estar bem adaptado às exigências de um veículo urbano podendo atingir uma autonomia de 300 km, com uma velocidade de ponta de 80 km/h, acumulando ainda as vantagens de ausência de emissão de poluentes e baixos níveis de ruído. Apesar destes avanços, será necessário desenvolver infra-estruturas viáveis para o armazenamento e transporte de H₂ de forma a generalizar o seu uso. Os mais optimistas apontam esta meta para 2010, podendo o H₂ tornar-se em

2030 uma das principais fontes de energia.

Além da pesquisa desenvolvida no campo da produção, têm sido também dispendidos esforços na redução do peso e volume de todo o sistema de modo a satisfazer as condições de conforto. No entanto, uma das prioridades para que haja aceitação pública, reside no cumprimento das normas relativas à segurança. Neste contexto, têm sido desenvolvidos sensores que permitam a detecção de fugas de H_2 do depósito. Neste campo destacam-se os sensores que utilizam enzimas imobilizadas (hidrogenases provenientes de microrganismos) que parecem ter uma sensibilidade superior aos baseados em catalizadores artificiais (Morozov et al., 2002).

Cianobactérias

As cianobactérias, anteriormente designadas por algas azuis-verdes, constituem um grupo grande e diversificado de microrganismos fotoautotróficos. A origem destes organismos remonta ao Pré-Câmbrico e há registos fósseis que indicam que as formas unicelulares surgiram no Pré-Câmbrico Inferior (há cerca de 3.500 milhões de anos), enquanto que as formas filamentosas eram particularmente abundantes no Pré-Câmbrico Médio (ver Figura 1), e terão tido um papel crucial na libertação de oxigénio para a atmosfera.

Actualmente, as cianobactérias têm uma ampla distribuição geográfica ocupando habitats terrestres, aquáticos (água doce e salgada), e ambientes extremos (nascentes termais e lagos gelados). Apesar de denominadas azuis-verdes, as cianobactérias apresentam uma variedade de cores que inclui o vermelho, o castanho, o amarelo, até mesmo o preto, devido às diferentes combinações dos pigmentos fotossintéticos: clorofila *a*, carotenóides e ficobiliproteínas. Estes microrganismos são responsáveis pela coloração das nascentes termais em Yellowstone e, presumivelmente, o Mar Vermelho deve o seu nome aos *blooms* de espécies planctónicas de *Trichodesmium*.

Todos os representantes deste grupo combinam a capacidade de realizar fotossíntese com libertação de oxigénio (semelhante à dos organismos eucarióticos, ex.: plantas)

com características tipicamente procarióticas. Muitas estirpes são capazes de fixar o azoto atmosférico (N_2) em amónia (NH_4^+), composto que pode ser utilizado por outros organismos, nomeadamente plantas e animais. Apesar de bastante uniformes em termos nutricionais e metabólicos, constituem um grupo diversificado em termos morfológicos, apresentando formas unicelulares, filamentosas e coloniais. Certas cianobactérias filamentosas têm a capacidade de diferenciar células estruturalmente modificadas e funcionalmente especializadas: os acinetos (células de resistência) e os heterocistos (células especializadas na fixação de N_2), ver Figura 1. Estas características, conjuntamente com as alterações que ocorrem durante o seu ciclo celular, distinguem as cianobactérias de outros organismos procariontes (ex. de outras bactérias) uma vez que estes não têm qualquer grau de diferenciação e desenvolvimento.

Várias estirpes de cianobactérias podem, ainda, estabelecer simbiose com uma enorme variedade de hospedeiros como protistas, animais, fungos e plantas. Em simbiose, alguns cianobiontes realizam fotossíntese e fixação de N_2 enquanto outros apresentam apenas uma destas propriedades (Whitton e Potts, 2000).

Enzimas envolvidas no metabolismo do H_2 em cianobactérias

Nas cianobactérias podem existir três tipos de enzimas directamente envolvidas no metabolismo do hidrogénio: (1) um complexo enzimático designado por nitrogenase, que cataliza a redução de N_2 a NH_4^+ com libertação obrigatória de H_2 , (2) uma hidrogenase de assimilação que recicla o H_2 libertado pela nitrogenase e (3) uma hidrogenase bi-direccional e que pode funcionar no sentido da produção ou do consumo de H_2 (Tamagnini et al., 2002; Figura 2).

A hidrogenase de assimilação, cuja função é reciclar o H_2 produzido pela nitrogenase, tem sido encontrada em todas as cianobactérias fixadoras de N_2 estudadas até ao momento. A hidrogenase bi-direccional é uma enzima comum a cianobactérias fixadoras e não-fixadoras de N_2 . Resultados obtidos recentemente, demonstraram que, todavia, não é uma enzima universal pelo menos nas estirpes fixadoras de N_2 (ver Tamagnini et al., 2000/2002; Figura 2).

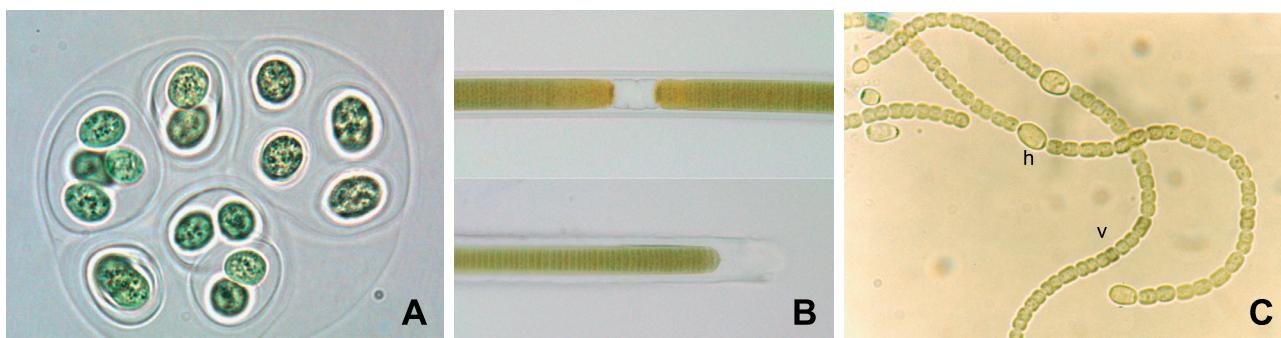


Figura 1 – Imagens de cianobactérias ao microscópio óptico. A - *Gloeothece* sp. ATCC 27152 - unicelular; B - *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 - filamentosas sem diferenciação celular; C - *Nostoc punctiforme* PCC 73102 - filamentosas com diferenciação celular; v - células vegetativas (fotossintéticas), h - heterocistos (fixadoras de N_2).

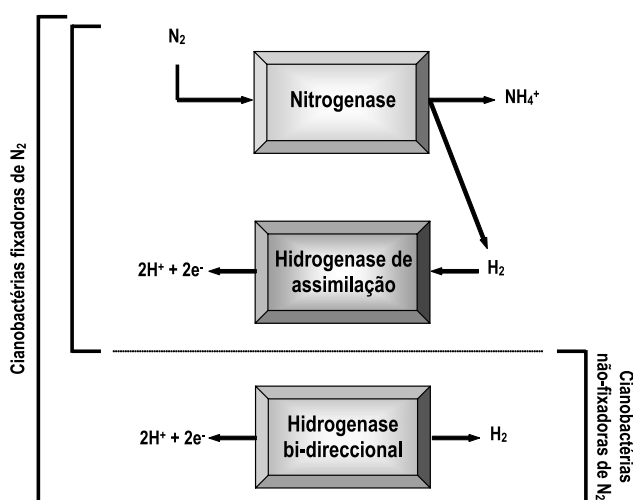


Figura 2 – Enzimas directamente envolvidas no metabolismo do hidrogénio em cianobactérias.

A nitrogenase é um complexo enzimático muito sensível ao oxigénio (O_2), pelo que as cianobactérias desenvolveram diferentes mecanismos e estratégias de modo a proteger a nitrogenase, não só do O_2 atmosférico, mas também do O_2 gerado intracelularmente pela fotossíntese. Esses mecanismos vão desde a fixação de azoto em condições exclusivamente anaeróbicas, a uma separação temporal ou mesmo espacial da fixação de azoto e produção de O_2 . A separação temporal (dia/noite) entre a fotossíntese e a fixação de azoto parece ser a estratégia geralmente adoptada pelas cianobactérias sem diferenciação celular (não-heterocísticas; ver Figura 1).

Em algumas estirpes de cianobactérias foram detectadas, para além da nitrogenase convencional, outras nitrogenases, designadas de alternativas, que diferem da primeira nas características físico-químicas e propriedades catalíticas. As nitrogenases alternativas parecem direccionar uma maior proporção de electrões para a produção de H_2 (ver Tamagnini et al., 2002).

Estratégias inovadoras de intensificação de bioprocessos para cianobactérias: produção ecológica de H_2

Nas cianobactérias fixadoras de azoto dois tipos de enzimas têm a capacidade de produzir H_2 : a nitrogenase e a hidrogenase bi-direccional. Nestes organismos, a produção total de hidrogénio é o resultado da libertação de H_2 pela(s) nitrogenase(s) e o seu consumo, principalmente, pela hidrogenase de assimilação. Consequentemente, é necessária a produção/selecção de mutantes deficientes na actividade de assimilação do H_2 (ver Figura 3).

A nitrogenase exige, ainda, uma elevada quantidade de ATP, o que diminui também a sua eficácia na conversão da energia solar. Por outro lado, a hidrogenase bi-direccional requer muito menos energia, mas é extremamente sensível ao oxigénio. Muitos outros parâmetros podem, também,

influenciar a produção fotobiológica de H_2 . A composição da fase gasosa, a idade e densidade da cultura, bem como a composição, pH e temperatura do meio de cultura são factores determinantes para o resultado final. A multiplicidade de variáveis que afectam a produção de H_2 é extremamente vasta e exige que se canalizem cada vez mais esforços (tanto económicos como humanos) para se atingirem num futuro próximo, resultados concretos.

Na Unidade de Microbiologia Celular e Aplicada (IBMC, U.P.) está a ser desenvolvido um projecto que tem como objectivo principal melhorar/aumentar a de produção de H_2 por cianobactérias. Estas cianobactérias podem ser utilizadas como um sistema viável para a produção de energia não poluente ou, em consórcio com outros microrganismos, fornecer-lhes a energia necessária para a realização de determinados processos, como por exemplo, bioremediação. Este projecto está a decorrer no Grupo de Microbiologia Celular e Aplicada do IBMC-U.P., equipa dirigida pelo Prof. Moradas Ferreira. Num conjunto de estirpes de cianobactérias, seleccionadas de acordo com a sua diversidade em hidrogenases, foi realizada uma análise molecular com o objectivo de verificar a presença/ausência de sequências de DNA semelhantes aos genes estruturais da hidrogenase de assimilação e da hidrogenase bi-direccional, e dos genes envolvidos na maturação destas enzimas. Paralelamente as actividades enzimáticas são avaliadas, para permitir a identificação das estirpes com maiores potencialidades para a produção de H_2 . Com estes dados estão em curso as seguintes manipulações: (1) eliminação da actividade da

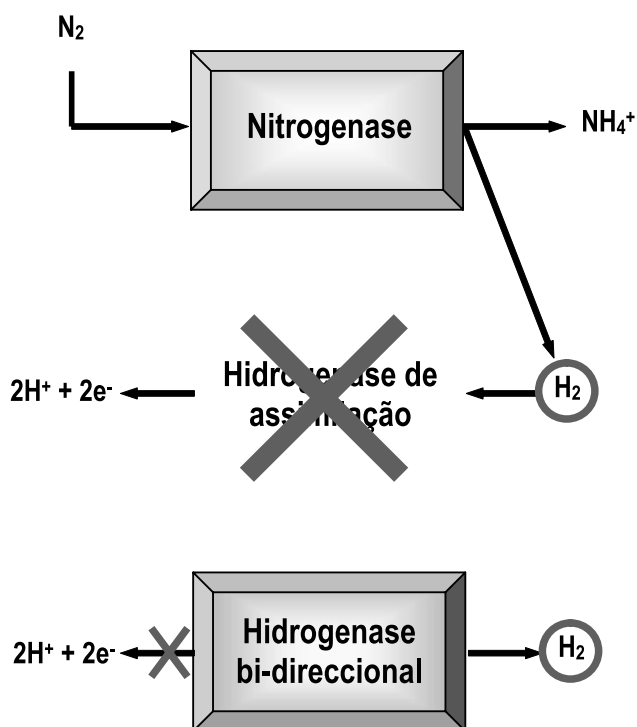


Figura 3 – Enzimas directamente envolvidas no metabolismo do hidrogénio em cianobactérias. Para uma produção eficaz de H_2 é necessário, por exemplo: 1) produzir/seleccionar mutantes deficientes na actividade de assimilação de H_2 (estirpes fixadoras de azoto), 2) identificar/”construir” uma hidrogenase produtora de H_2 insensível ao O_2 (estirpes não-fixadoras de azoto).

hidrogenase de assimilação (produção/rastreamento de mutantes e/ou controlo das condições ambientais), (2) selecção de mutantes cuja hidrogenase bi-direccional seja menos sensível ao O₂ ou (3) cuja nitrogenase tenha menores requisitos energéticos. Posteriormente, será necessário testar a robustez fisiológica destas estirpes em bioreactores, sendo a sua eficácia quantificada pela produção de H₂ e critérios de estabilidade.

Perspectivas futuras/Futuros desenvolvimentos biotecnológicos

Actualmente, tem sido feito um grande esforço para caracterizar as hidrogenases das cianobactérias em termos fisiológicos e moleculares, no entanto a aplicação prática destes conhecimentos está pouco desenvolvida. É fundamental investir em processos biotecnológicos já que, quando concebidos e implementados correctamente, possibilitam reduções drásticas de custos e claras vantagens ambientais em relação aos processos químicos convencionais de obtenção de energia.

Um obstáculo significativo a uma maior disseminação de processos/sistemas biológicos para a produção de energia, ou de outros produtos industriais, é a normalmente baixa eficiência. Em sistemas não-biológicos (reacções catalíticas) é frequente recorrer-se a valores extremos de turbulência, temperatura, pH e pressão para a intensificação dos processos (aumento da produtividade), utilizando diferentes reactores. Contudo, com materiais biológicos não é possível utilizar-se turbulência ou outros métodos convencionais de intensificação, tendo que se optar por estratégias alternativas.

A produção fotobiológica de H₂ em bioreactores pode ser limitada, por exemplo, pela baixa eficiência de conversão da energia solar, baixa intensidade luminosa (saturação da produção), elevada intensidade luminosa (fotoinibição do crescimento celular e da produção de H₂). Alguns destes problemas podem ser ultrapassados através da construção de bioreactores com uma configuração adequada a uma produção eficiente (Ogbonna e Tanaka, 2000). Posteriormente, é necessário ajustar os resultados das optimizações realizadas nos protótipos de laboratório (volumes reduzidos) para bioreactores de capacidade adequada à produção de H₂ em grande escala.

Redes de cooperação

Actualmente, em vários países, está a ser realizada investigação básica e aplicada com o objectivo de explorar os microrganismos como produtores fotobiológicos de hidrogénio. O esforço de investigação dos diversos países tem sido coordenado na União Europeia pela Acção COST 841 "Biological and Biochemical Diversity of Hydrogenases" (<http://cost.cordis.lu/src/home.cfm>) e a nível mundial pelo IEA Hydrogen Agreement Annex 15 "Photobiological Hydrogen Production" (<http://www.iea.org/>). No 6º Programa Quadro da UE, uma das áreas prioritárias é o estudo e aplicação de fontes de energia renováveis e limpas, entre as quais se distingue o hidrogénio (<http://www.cordis.lu/fp6/activities.htm>).

Referências

- Benemann, J R (1996) Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nat. Biotechnol.*, 14:1101-1103.
- Benemann, J R (1997) Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, 22:979-988.
- Lindblad, P e Tamagnini, P (2000) Cyanobacterial hydrogenases and biohydrogen: Present status and future potential, pp. 143-169, In Miyake, J, Matsunaga, T e San Pietro, A (eds.), *Biohydrogen II – An Approach to Environmentally Acceptable Technology*. Elsevier Science, Ltd, Oxford, UK.
- Morozov, S V, Karyakina, E E, Zorin, N A, Varfolomeyev, S D, Cosnier, S e Karyakin, A A (2002) Direct and electrically wired bioelectrocatalysis by hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*. *Bioelectrochemistry*, 55: 169-171.
- Ogbonna, J C e Tanaka, H (2000) Photobioreactor design for photobiological production of hydrogen, pp. 245-261, In Miyake, J, Matsunaga, T e San Pietro, A (eds.), *Biohydrogen II – An Approach to Environmentally Acceptable Technology*. Elsevier Science, Ltd, Oxford, UK.
- Tamagnini, P, Axelsson, R, Lindberg, P, Oxelfelt, F, Wünschiers, R e Lindblad, P (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 1-20.
- Tamagnini, P, Costa, J-L, Almeida, L, Oliveira, M-J, Salema, R e Lindblad, P (2000) Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. *Curr. Microbiol.*, 40: 356-361.
- Whitton, B A e Potts, M (2000) *The Ecology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

***Perkinsus atlanticus* – Desenvolvimento de um método de diagnóstico para detecção da infecção em moluscos bivalves**

Leite, R.M., Rodrigues, P.M., Elandalloussi, L.M., Afonso, R.M., Nunes, P.A. and Cancela, M.L.

Biologia Molecular e Biotecnologia, CCMar, Universidade do Algarve –Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

***Perkinsus atlanticus* - Parasita responsável pela infecção de moluscos bivalves**

Diferentes espécies do género *Perkinsus*, um protozoário parasita pertencente ao novo phylum *Perkinsea*, podem ser encontradas mundialmente e constituem uma séria ameaça aos moluscos bivalves como as ostras, amêijoas, abalones e vieiras, os quais têm um papel importante não só do ponto de vista comercial, mas também ecológico [1]. O *Perkinsus atlanticus* (*P. atlanticus*) foi descoberto em finais dos anos oitenta tendo sido descrito como a principal causa de mortalidade da amêijoia *Ruditapes decussatus* [2]. Desde então tem sido observado nas espécies *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* em Portugal, Espanha, Itália e França [3]. Estudos recentes descrevem uma acentuada contaminação das áreas de cultivo da amêijoia no sul de Portugal [4], apontando ainda o parasitismo pelo *P. atlanticus* como responsável pelo aumento da susceptibilidade a infecções oportunistas por bactérias e vírus no hospedeiro [5].

Em Portugal, a Ria Formosa é responsável pela maioria da produção de moluscos bivalves, em particular da amêijoia *Ruditapes decussatus*, representando a sua cultura um papel fundamental na economia da indústria local. A produção desta espécie corresponde a cerca de 80 a 90% da produção nacional de moluscos, tendo-se vindo a verificar nos últimos anos um decréscimo da mesma de 8000-10000 toneladas/ano na década de oitenta para 3000-3500 toneladas em 1998, para o qual tem contribuído de maneira decisiva a infecção pelo

P. atlanticus. Resultados preliminares demonstram também a presença deste parasita nas ostras do sul de Portugal, embora com níveis vestigiais comparados com os existentes nas amêijoas [6]. As semelhanças entre as ostras *Crassostrea virginica* [7] (presente ao longo do golfo do México e costa sudeste dos Estados Unidos) e *Crassostrea gigas* (Sul de Portugal) e os elevados níveis de infecção detectados na primeira pelo parasita *Perkinsus marinus* (*P. marinus*) [8,9] conjuntamente com o desenvolvimento do comercio mundial deste bivalve, fazem temer o alastramento da infec-

ção o que certamente traria resultados catastróficos aos já frágeis stocks da ostra *Crassostrea gigas*, existentes no sul de Portugal.

Este parasita encontra-se principalmente nas brânquias dos organismos infectados, pelo que os sintomas desta doença são nomeadamente lesões nas brânquias que levam a uma redução das capacidades respiratória e de filtração e conseqüentemente à morte do animal. No entanto não se encontra referenciado qualquer efeito adverso no homem pelo parasita, que o ingere após cozinhado.

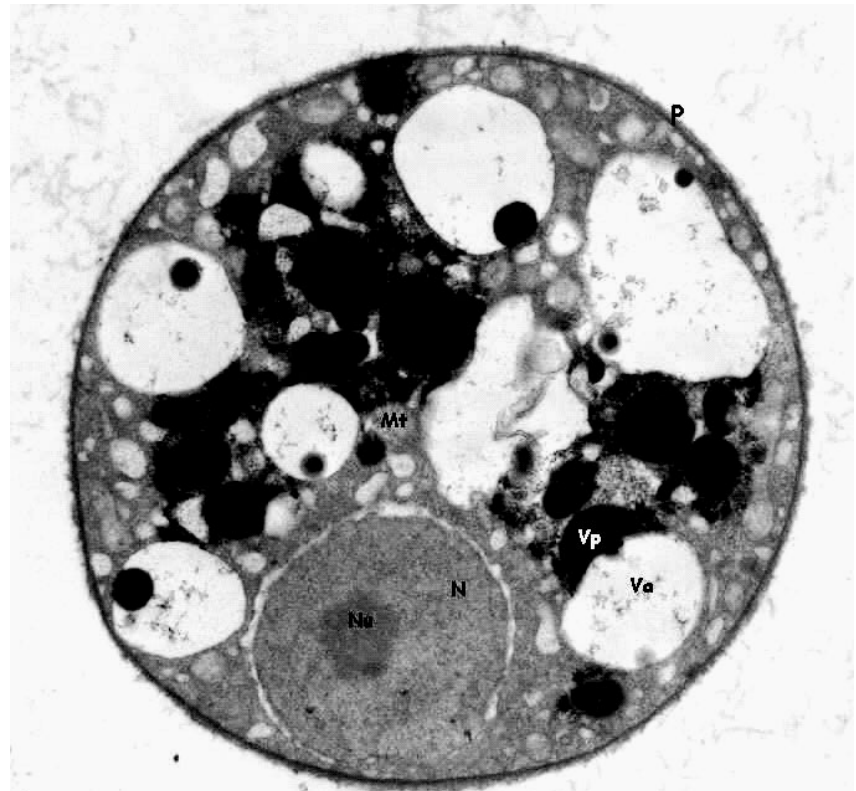


Figura 1 – Fotografia de microscopia electrónica (14000x) de um trofozóide de *Perkinsus atlanticus* obtido a partir de uma cultura celular existente no nosso laboratório. A amostra foi fixada em tampão de Cacodilato de Sódio.
N-Núcleo; Nu-Nucleólo; Va-Vacúolo; Vp-Vacuoplasto; Mt-Mitocôndria; P-Parede celular.

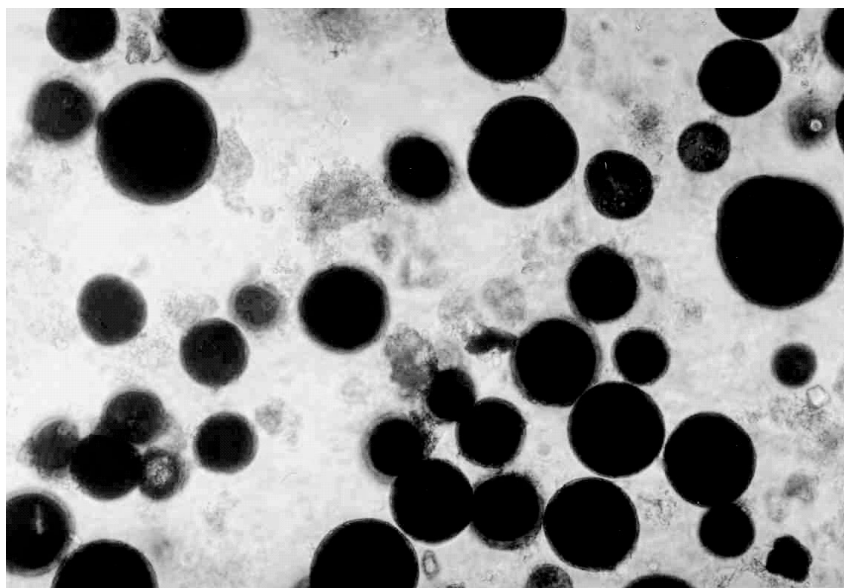


Figura 2 – Fotografia obtida em microscópio invertido (320x) de *Perkinsus* corados com uma coloração específica de Lugol 4% após incubação durante uma semana em RFTM (Ray Fluid Thioglycolate medium). Tamanho médio das esferas 55µm.

Uma análise detalhada da infecção pelo parasita ao longo da costa nacional aponta para uma infecção global da mesma, havendo no entanto uma maior incidência na Ria Formosa e na Ria de Aveiro (Figura 3). Dentro destes dois locais intrinsecamente diferentes, nomeadamente a nível ambiental, verifica-se uma taxa de mortalidade mais elevada na Ria Formosa, embora os níveis de infecção da amêijoia, determinados através de técnicas histológicas não apresentem grande diferença entre os dois ecossistemas. Estes resultados sugerem que sejam factores ambientais como a temperatura, salinidade e a concentração de certos metais (em particular o ferro), e principalmente a poluição por contaminantes (decapantes das embarcações e tintas sintéticas) os responsáveis quer no desenvolvimento de condições de resistência da amêijoia à infecção, quer na taxa de crescimento e/ou de virulência do próprio parasita.

Desenvolvimento de um novo método de diagnóstico

Com o desenvolvimento da economia mundial e o concomitante aumento de trocas de géneros alimentares, as infecções parasitárias representam um importante problema, dado o seu

aumento significativo nos últimos anos nos Países industrializados e também nos Países menos desenvolvidos onde o impacto na economia destes se revela por vezes desastroso. Relativamente às amêijoas este problema coloca-se essencialmente na gestão de stocks deste molusco, onde existe um grande perigo de infecção nas passagens das maternidades para os viveiros e mesmo entre viveiros no caso do processo de engorda. Revela-se assim imperativo a existência de métodos de diagnóstico capazes de responderem às exigências de um mercado cada vez mais competitivo e exigente tanto a nível quantitativo e exigente quanto a nível qualitativo. Idealmente, um bom método de diagnóstico deverá ser de rápida e fácil execução, sensível, específico e económico. Dentro dos

métodos de diagnóstico utilizados na detecção de parasitoses, os métodos indirectos de diagnóstico molecular bastante mais específicos, têm-se revelado como os mais válidos, ao contrário dos bioquímicos e hematológicos, menos fiáveis.

Numa primeira fase foi desenvolvida uma cultura clonal *in vitro* de *P. atlanticus* a partir da amêijoia da costa Algarvia *Ruditapes decussatus* [10], utilizando um meio de cultura e condições optimizadas. A identidade dos clones foi inequivocamente estabelecida tendo sido completamente sequenciado o gene do ARN ribossomal. As sequências do gene ARNr compreendidas entre a unidade 5S e a LSU (large subunit) do clone de *P. atlanticus* possuem uma identidade de cerca de 99% relativamente às sequências de *P. atlanticus* previamente isoladas [10].

As infecções por *Perkinsus* são rotineiramente diagnosticadas por técnicas histológicas ou por ensaio FTM (Fluid thioglycollate médium) [11]. Ambas as técnicas são demoradas e pouco específicas, pelo que nos últimos anos métodos de diagnóstico alternativos, nomeadamente ensaios baseados na técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) a nível da espécie e/ou de uma estirpe específica têm sido desenvolvidos para detectar *P. marinus* [12,13], *P. atlanticus* [14,15] e *Perkinsus andrewsi* de *Macoma balthica* [16]. Adicionalmente a estes, foi desenvolvido recentemente um ensaio específico a nível do género *Perkinsus* [10] baseado nos oligonucleótidos de iniciação PER1 e PER2, desenhados a

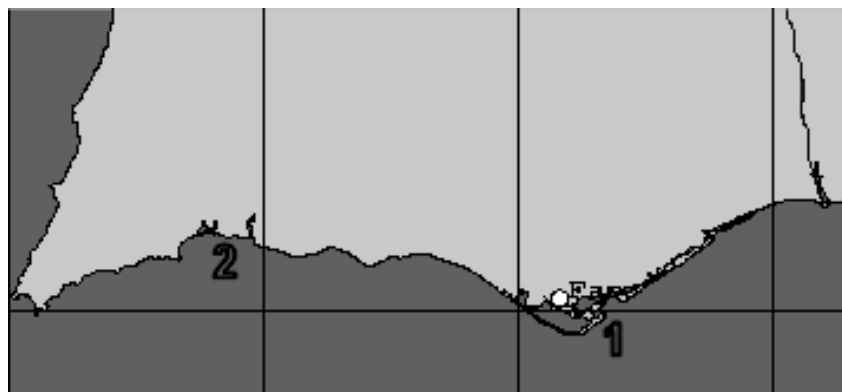


Figura 3 – Mapa da região algarvia. Os sítios mais infectados estão representados por algarismos. 1) Ria Formosa (Olhão-Faro) e 2) Ria do Alvor.

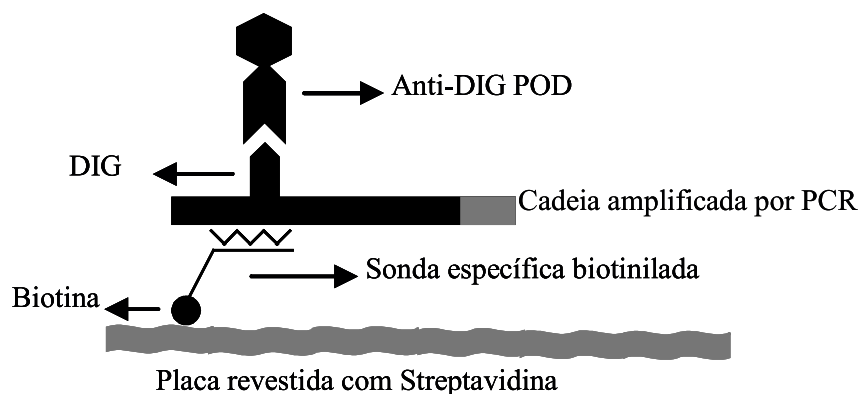


Figura 4 – Esquema do ensaio PCR-ELISA. O produto do PCR é marcado por incorporação de DIG-dUTP (digoxigenina-dUTP) durante o PCR. A sonda biotinizada específica para *Perkinsus* é imobilizada na placa revestida com Streptavidina sendo hibridada com o produto do PCR marcado. A detecção é feita por uma peroxidase conjugada a um anticorpo anti-DIG que por sua vez possui um substrato da POD (oxidoreductase do peróxido) dando origem a uma coloração dependente da concentração do produto amplificado (sequência alvo do *Perkinsus*). A leitura dos resultados é feita posteriormente num ELISA micro-reader a um comprimento de onda de 405nm.

partir de uma região de ARNr comum a todas as espécies de *Perkinsus* conhecidas, tendo sido validados a nível da especificidade com bivalves infectados e dinoflagelados de cultura [10]. Este ensaio apresenta como vantagem o facto de não detectar espécies de *Perkinsus* para as quais não existam ainda ensaios específicos.

Dentro dos ensaios de imunodiagnóstico, o ensaio ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) representa um sistema de diagnóstico rápido e sensível largamente utilizado na detecção de organismos patogénicos. Este tipo de ensaio foi já desenvolvido na detecção de *P. marinus*, utilizando anticorpos mono- e policlonais contra *P. marinus* [17,18]. No entanto, a dificuldade na obtenção de anticorpos específicos contra as várias espécies de *Perkinsus* e problemas no reconhecimento do antigene noutros organismos impediram a implementação desta técnica como uma ferramenta de diagnóstico [19,20]. Atendendo a esta problemática, desenvolveu-se um método rápido de detecção de *P. marinus* e *P. atlanticus* baseado num ensaio de PCR-ELISA em microplaca [21] (Figura 4). Este ensaio permite a identificação do *Perkinsus* ao nível da espécie. A combinação da extracção do ADN, da amplificação por PCR e do reconhecimento por ELISA que gera um ponto de saturação colorimétrico, resulta num teste simples e sensível, podendo ser automatizado,

que pode ser simultaneamente aplicado a numerosas amostras de ADN não só da amêijoia como de outros bivalves existentes na costa Portuguesa. Este método revela-se o primeiro instrumento disponível que permite a quantificação e identificação da espécie do parasita, de modo a assegurar a vigilância e segurança dos stocks existentes, assim como a qualidade das sementes importadas de outros viveiros. Assim, a capacidade de rapidamente e com precisão, detectar o parasita nas amêijoas tem importantes aplicações tanto a nível científico como industrial.

Os estudos actualmente a decorrer visam essencialmente o estabelecimento de um método terapêutico capaz de impedir a proliferação do parasita, não trazendo, no entanto, qualquer efeito adverso, quer ao hospedeiro (amêijoia), quer ao ecossistema ou ao consumidor final: o Homem.

Agradecimentos

A Fotografia da Figura 1 foi efectuada pelo Professor Carlos Azevedo no âmbito do trabalho realizado para o Projecto CLAM (POCTI/C/BIO/12143/98). Trabalho financiado em parte pelos projectos CLAM (PRAXIS/C/BIO/12143/98) e PERKLAM (PDCTM/C/MAR/15308/1999), ambos da Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Referências

- [1] Goggin, C.L. (1995) *Aquaculture* **141**, 25-30.
- [2] Azevedo, C. (1989) *J. Parasitol.* **75**, 627-635.
- [3] Goggin, C.L. (1992) *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **12**, 174.
- [4] Ruano, F. (1997) in: U.S: Dept. Commer. NOAA Techn. Rep., Vol. NMFS 129.
- [5] Montes, J.F., Durfort, M. and Garcia-Valero, J. (2001) *Dis. Aquat. Org.* **46**, 57-66.
- [6] Leite, R.M. and Cancela, M.L. *Resultados não publicados*.
- [7] Ford, S. (1996) *Journal of Shellfish Research* **15**, 45-56.
- [8] Mackin, J.G., Owen, H.M. and Collier, A. (1950) *Science* **111**, 328-329.
- [9] Andrews, J.D. and Hewatt, W.G. (1957) *Ecol. Monogr.* **27**, 1-25.
- [10] Robledo, J.A.F., Nunes, P.A., Cancela, M.L. and Vasta, G.R. (2002) *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**, 414-422.
- [11] Choi, K.-S., Wilson, E.A., Lewis, D.H., Powell, E.N. and Ray, S.M. (1989) *Journal of Shellfish Research* **8**, 125-131.
- [12] Marsh, A.G., Gauthier, J.D. and Vasta, G.R. (1995) *J. Parasitol.* **81**, 577-583.
- [13] Robledo, J.A.F., Wright, A.C., Marsh, A.G. and Vasta, G.R. (1999) *The Journal of Parasitology* **85**, 650-656.
- [14] Herrán, R., Garrido - Ramos, M.A., Navas, J.I., Rejón, C.R. and Rejón, M.R. (2000) *Parasitology*, 345 - 353.
- [15] Robledo, J.A.F., Coss, C.A. and Vasta, G.R. (2000) *Journal of Parasitology* **86**, 972-978.
- [16] Coss, C.A., Robledo, J.A.F. and Vasta, G.R. (2001) *J Eukaryot Microbiol* **48**, 52-61.
- [17] Dungan, C.F. (1991) *Journal of Shellfish Research* **10**, 306.
- [18] Dungan, C.F. and Hamilton, R.M. (1997) *Journal of Shellfish Research* **16**, 330-331.
- [19] Dungan, C.F., Hamilton, R.M., Bushek, D., Cardinal, J. and Lewitus, A. (2000) *Journal of Shellfish Research* **19**, 643-644.
- [20] Bushek, D., Dungan, C.F. and Lewitus, A.J. (2002) *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**, 11-16.
- [21] Elandaloussi, L.M., Leite, R.M., Afonso, R., Nunes, P.A., Robledo, J.A.F., Vasta, G.R. and Cancela, M.L. (2003) *Molecular and Cellular Probes*, Submitted.

Biotechnology in Portugal: promoting downstream private initiative and foreign investment should be the next priorities

Pedro de Noronha Pissarra

CEO Biotecnol SA and Chairman of Portuguese Bioindustries Association, Taguspark, Edifício Inovação 4, N°809. 2780-920 Oeiras, Portugal; pnp@biotecnol.com

In March 2002 EU leaders gave full backing to the European Commission's life sciences and biotechnology strategy at the Barcelona Summit. They have followed their Stockholm commitments on biotech. The recognized fact is that no other technology offers the same potential for job creation, innovation and growth. Biotechnology is a broad economic opportunity in healthcare, food and industrial applications and offers considerable environmental and sustainability benefits. While Europe has now more biotech companies than the US, European companies produce fewer products, employ fewer people and have less finance to develop the industry. Even though 2000 was the best year yet for European biotech, the USA increased their lead. The European Commission estimates that by 2005 the European biotechnology market could be worth over € 100 billion. By the end of the decade, global markets including sectors where life sciences and biotechnology will constitute a major portion of the new technology applied could amount to over € 2000 billion (equivalent to the 2001 GDP of Germany). Such a highly dynamic market relies on highly innovative and even more dynamic Small and Medium Enterprises (SME), that initially started as small companies (start-ups) with only a few people, virtually structured and scarcely financed.

A nurturing and favourable environment is essential for the establishment and expansion of a young start-up. The key factors for a nurturing environment are related to the availability of sound infrastructures e.g. bioincubators, sectorial clusters, skilled labour, adequate legislation and above all and most importantly, a sophisticated and knowledgeable venture capital industry, which plays a key role in such nurturing environment.

In environments where the venture capital industry is well developed e.g. the USA and some European Countries, companies are usually financed by attracting local investment that will in most start-up cases, allow them to learn and understand the market where they play, gain experience, develop their technology right and understand what was wrong in cases where the things don't work out as planned. Contrary, in an environment such as Portugal where the financing pillar for a knowledge-based or "brain intensive" industry such as Biotech is not developed at all, starting-up a company is all about creating the conditions for attracting foreign investment. That is however not a trivial task as we are faced with a typical "chicken & egg" type of situation, that

is, even when you have top-notch science and people, how do you start-up, create those conditions and further build a company when you **don't have** the right financial resources, the right infrastructure, the right nurturing environment and above all, the right investor? Most cases of success in the biotech sector come from countries where start-ups are able to have competitive access to laboratories infrastructures, "true" venture capital and well-structured governmental or regional policies at all levels *i.e.* legal, fiscal financial, academic, ethical and industrial, that enables biotech to develop as an industry.

In Portugal it exists a highly developed "upstream" infrastructure promoted by the government, but where is the "downstream" infrastructure for companies creation and for turning science into products?

The lack of start-ups in Portugal is somehow linked to a lack venture capital and in general the lack of a nurturing environment for promotion of entrepreneurship. To our opinion that fact is due to the lack of stimulation of the sector downstream, *i.e.* at the level of companies creation, incubation and at the level of helping and advising young scientists/entrepreneurs in turning "good-science into good products". The cultural aspects don't help either. The "fear of failure" attitude, existing amongst investors, scientists, entrepreneurs, university staff and governmental bodies is the hindering fact behind the development of such an industry.

This is odd for people once renowned to be fearless seafarers. Even more odd is the fact all the basic infrastructure upstream of the market seems to be in place, and Portugal is renowned for the high quality of its science and the ability for establishing international collaborations (Sabine Louët, March 2000 Volume 18 Number 3 pp 276 - 277). Also in regulatory and legal terms Portugal is compliant with the rest of the European legislation and in most cases it has successfully transposed most of the sector directives that have not yet been transposed in other European countries.

Strong government support for high technology has been a focus for the Portuguese government since the early 90's. Even though R&D spending was only 0.68% of the gross domestic product (GDP) in 1997 compared with an average of 1.84% in other EU countries in 1996, the Portuguese authorities have recently significantly increased spending. Thus, the budget devoted to research centers more than

tripled between 1995 and 1999 from US \$7.3 million to US \$29.3 million. Following a nationwide consultation on future science and technology development, the total budget for science and technology in 2000 was estimated to be US \$509 million—a 20% increase compared with the previous year. Furthermore Forty percent of Portuguese graduates obtain their PhDs abroad—an unusually high figure for a European country (Sabine Louët, March 2000 Volume 18 Number 3 pp 276 - 277). Indeed the first efforts made to increase Portugal's competitiveness in this area were the creation of qualified human resources able to respond to the requests of this highly technological industry. This was successfully achieved since more than 9223 scholarships for masters and PhD were financed between 1990 and 1998 by CIÊNCIA and PRAXIS two governmental measures (Fig 1). In Portugal there exists some 7 or 8 biotech companies active in biotechnological fields, ranging from “green” to “red” biotech, some are young start-ups and only one or two are reasonably mature biotech companies and in total, this sector would employ up to 100-120 people in Portugal. Thus, a clear disproportion exists between the lack of entrepreneurs and managers and the growing pool of qualified PhDs and MSc's as well as graduates available. Therefore on a *per-capita* basis, biotech in Portugal is not a very efficient industry despite the successful governmental achievements in helping creating a skillful workforce and a first class R&D environment.

Although the government never seemed to have had a well-structured and well-defined biotech development policy, some measures were created by the government or by agencies set to manage government funds, like the Innovation Agency (ADI).

1. ADI currently gives priority in the funding of projects in consortium between universities and companies.
2. Also a law for awarding substantial tax incentives to R&D companies, was created and is enforced by the same agency.
3. Another valuable measure was the the creation of grant incentives given to companies, for employment of Ph.D. and M.Sc. level researchers. In the later scheme, the salary and social costs of each scientist subsidised in 75% during the first year, 45% during the second year and 25% during the third year of their employment period.

This latter measure shows the willingness of the government to create opportunities for the growing pool of new PhDs, which over the past 10 years have increased at an average rate of 10% per year for all areas and over 18% per year for biology based fields. However the crude reality is that most of these PhD's will be jobless, unless the government promotes the creation of a “downstream” market for employment of this highly skillful workforce in which it has invested over a decade. It is nevertheless clear the non-utilization by industry of this growing pool of qualified PhDs increasingly available.

New private as well as public initiatives available in Portugal and aiming at promoting the creation and expansion of biotech companies.

The Portuguese Bioindustries Association (APBio) has been over the last few years the main and probably the only driver for the creation of new biotech companies, not only by direct support but also by setting up initiatives for promoting entrepreneurship. To my knowledge no University in Portugal teaches scientists at universities to become entrepreneurs.

A good example of an initiative that promoted the development of an entrepreneurship behaviour in qualified human resources and the creation of new start-ups was the The Bioentrepreneurship Competition. APBio with the help of ICEP – The Portuguese Institute for External Commerce which is a body of the Ministry of Economy, created during 2001 a competition between graduate and post-graduate students and professionals in the biotechnology and economic fields. During this contest the most interesting and lucrative idea/business in the biotechnology sector were presented to a jury in the form a business plan which were then studied and evaluated by venture capitalists. Finalists teams were pre-selection and an entrepreneurship workshop was organized for them to improve their business plans for the final presentation. In last year's contest the jury selected 5 finalist teams of which two were the winners of the Bioentrepreneurship Contest 2002 this were awarded cash for their company incorporation as a reward.

Taguspark the main science & technology park in Portugal, representing an investment well over US \$250 million has a track record in not only fostering start-ups in Biotech but also in helping them out in expanding their business plan. A recent initiative of Taguspark has been to support first-tier companies in their respective sectors by investing directly into their equity. In 2002 Taguspark has directly invested in 1 Biotech company located in the science park, which is a sign that private initiatives of this kind are now starting to appear in the biotech sector and are considered to be an alternative to the lack of venture capital for this sector.

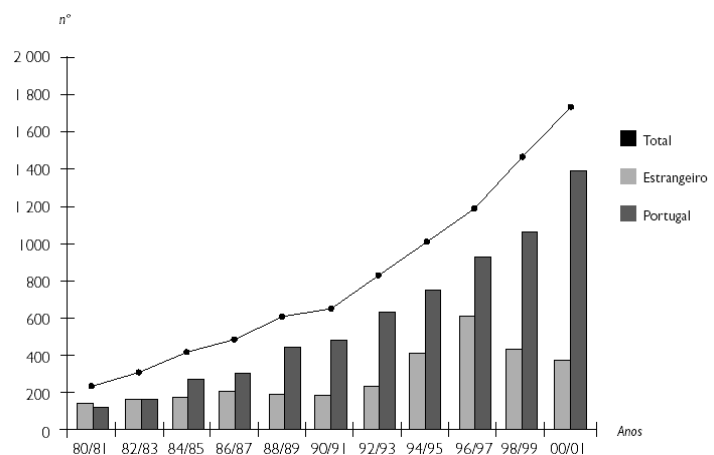


Figura 1 – Number of PhDs in Portuguese Universities between 1980 and 2001.

PPCE – Programme for Productivity and Economic Growth

The Portuguese ministry council resolution of last June 2002 approved the PPCE – Programme for Productivity and Economic Growth, which aims at the creation of a favourable environment for the insurance of sustainability, development and expansion of Portuguese companies thus resulting in an increase of the overall Portuguese economy competitiveness. Under these resolutions the NEST programme was created.

NEST – promoting the creation of newly created science & technology oriented companies.

Within this programme R&D projects directed to the conception, development and production of new products, services or processes are eligible to apply either through the creation and establishment of technological based companies or through the sustainability of existing ones as long as they are equity financed and risk capital companies. These companies must also create and develop a straight relation with R&D centres. The beneficiaries of this programme are individuals or collective entities that promote the establishment of a new technological support enterprise or recently established technological support enterprises with no significant activity. The projects promoters must demonstrate technical and financial capability suitable to the project's objectives and participate with the minimum of 5% in the companies' capital stock. The project must foresee the participation of the SME Risk Capital Syndication Fund – IAPMEI in an equal amount as the promoters up to 15% of the total capital stock, with the limit of 375,000€, and at last the participation of a venture capital entity in the management or administration of the company which will complete the companies' capital stock. This programme also contemplates the financing of the venture capital entity by the SME Risk Capital Syndication Fund – IAPMEI through a bank loan with zero interest (principal payment after a 5-year period) up to 80% of its participation in the companies' capital stock. When the applications are deemed eligible, the companies shall be awarded the status of NEST enterprise, approved by ministerial orders from the Ministers of Economy and of Science and Higher Education and become automatically entitled to the following supports:

- Support to the integration of executives with a high university degree (doctor, master...) in R&D enterprises and institutions;
- Support within the framework of the "Executives" Programme;
- Financial support to the materialisation of directly productive investments, to R&D and to quality, within the framework of SIPIE - SMALL BUSINESS INITIATIVES INCENTIVE SCHEME;
- Financial support within the framework of SIUPI – INCENTIVE SCHEME FOR THE USE OF INDUSTRIAL PROPERTY UTILIZATION;
- Support related enterprise setting up in technology poles,

science and technology parks, incubation units or innovation centers.

IDEIA – Support to applied research with a business development orientation

Another rise of the programme PPCE mentioned above is the support to innovation, research and applied development essential to the construction of a new model of sustained productivity increase.

In this programme companies and research centres establish a consortia for the development of research and technological activities in the form of 3-year projects.

The consortia consist of one company and one research entity, being the company the consortia leader. Foreign partners can also participate and strengthen the project. The projects should foster results enhancement and technology transfer from research entities to the private sector, aiming at the creation and incorporation of technologies favouring the development of new products, processes or services.

The other goals of this programme are the integration of training actions associated to technological development and technological consulting actions required by the project and also the participation of national consortia in combined international technological research and development activities, especially within the framework of Community or international programmes.

The companies in the consortia must have been legally formed in the minimum of 2 years and present a balanced economic and financial situation as defined in due legislation. Nest enterprises do not have to comply with these requirements. All entities in the consortia also need to display scientific and financial capabilities to guarantee the accurate development of the project.

The programme objectives can be accomplished with two types of projects

1. "Industrial development" actions – development of new technologies, and acquisition of new capabilities;
2. "Pre-competition research" actions – development of prototypes and pre-series of pilot actions, in order to validate technologies subject to lab demonstration within a business environment, and promotion actions leading to the economic enhancement of the results.

Projects submitted under this programme whose granted incentive is inferior to 100,000€ have a non-refundable finance, if the incentive exceeds this value the project will have a non-refundable and a refundable component.

For industrial research or pre-competition research, the amount of the granted incentive corresponds to 50% and 25% of eligible expenses, respectively.

Overall the maximum incentive rate cannot exceed 75% of eligible expenses for industrial research projects and 50% of eligible expenses for pre-competition research projects.

The financing of indispensable expenses for the reinforcement of the technological competence of the companies is non-refundable, namely the expenses with human resources, internationalisation of the project and finally expenses with industrial property rights protection.

Patent or utility model granting requests resulting from projects supported by IDEIA shall have preferential access to SIUPI - INCENTIVE SCHEME FOR THE USE OF INDUSTRIAL PROPERTY UTILIZATION.

Technology, people and money, are three key parts for the success of any knowledge based industry. They exist in Portugal but are not integrated.

Science and technology are a key part for setting up biotechnology as an industry, the other key parts are people and money. Although existent in Portugal, these two latter parts of the puzzle don't seem to be as yet integrated in a general "business model", that would allow all the existent scientific and technological potential to reach the market place.

Its all about people.... brave people!

Portugal is finding its entrepreneurs amongst ambitious people that either contacted directly with the biotech sector both at nationally and abroad, through scientists that carried out their studies abroad and were largely influenced by an entrepreneurial culture or activity from other countries. The fact is that there are not many entrepreneurs in the biotech sector in Portugal probably due to the lack of a nurturing environment and lack of a direct "contagious" of academic researchers by the "entrepreneurship bug", as one would find in other countries. Unfortunately, when some of these academic researcher venture out to become potential entrepreneurs and try to take an idea from their labs to a potential market, they immediately are faced with the "chicken & egg" type of situation and they therefore are obliged to give up on their endeavours after a while. We are aware of 3 or 4 examples in which that happened. Instead and quite understandably, these scientists are faced with the only solution for carrying out their projects, which is to live under the umbrella of research grants. These however are not often adequately structured, nor suitable for industrial biotech projects and again these potential projects don't even get on the path that would potentially allow them reach the market. Even on rare occasions, when these grants can be the only solution for achieving certain degree of funding, that may complement certain private investment raised, the lengthy analysis time, the evaluation criteria linked to academic objectives and highly cumbersome administrative process associated to these grants eventually kill the momentum for a good project to take off.

"Voucher" Capital or Venture Capital? – Where is the "clever" money?

If you ask what is the venture-funding climate for biotechnology in Portugal? And how do budding entrepreneurs secure

funding for latter stage biotechnology projects? Unfortunately the answers that I would have to give you are "what venture funding climate??" and "they don't! At least not from national investors". The lack of a **true** venture capital industry is in my opinion the major bottleneck for the development of a cost-intensive industry such as biotech.

Despite the availability of investment funds, although of small dimension, the problems that are easily identified for the lack of their investment are linked to a complete lack of understanding by national investment firms, of the biotech industry its dynamics as well as its long lasting and substantially large burning rates, but as well its highly profitable nature. Furthermore, despite the establishment of governmental funds managed by governmental related institutions, early-stage and especially expansion investment is almost non-existent in Biotech in Portugal. On the top of that one should also question if public money – tax payers money - should be put into venture capital funds when these are scarcely invested in strategic sectors for the Portuguese society such as knowledge based industries. Such a scenario obviously raises the question if the problem in Portugal is the actual lack of "venture capital" or the lack of "venture capitalists??" Not until the existing investment funds start to invest on themselves so that a certain degree of specialisation, sophistication and understanding of the biotech industry is attained, I am afraid that Biotech as an industry will never develop in Portugal. Instead Biotechnology will continue to have a misleading connotation as being a science and not an industry. I am however confident that the negative climate for funding Biotech as an industry in Portugal, will change in the near future as Portugal will have absolutely no choice other than to make a better and more efficient use of its existing scientific and technological institutions and infrastructures. This effective utilisation of science & technology is most commonly observed in the UK, France, Denmark, Holland among other countries and especially in the USA where top level institutions do create value for themselves by producing, patenting and further licensing their results. From a national perspective, the need for transforming the technological potential into real products with a real contribution to the quality of life of citizens will be certainly the driver for attracting specialised investment and investors into the field. These will be either national or foreign. Most importantly an effective value creation at these scientific and technological institutions and infrastructures, will be the only solution for helping existing researchers in keeping their jobs, as funds will not be around forever.

It will thus be ironic not to include Portugal as a contributor for the aims set at the EU Summit in Lisbon in March 2000, where the European Heads of State declared that: **"By 2010 Europe is to become the most competitive and dynamic knowledge-based economy in the world, capable of sustainable growth with more and better jobs and greater social cohesion"**. We believe that for Portugal to be part of such an objective, all that young entrepreneurs in this country need to do, is to venture-out and to believe in their own capabilities. All the rest will follow naturally.

STAB VIDA – Uma Empresa Portuguesa de Investigação e Serviços em Biologia Molecular e Biotecnologia

Sofia Goes, Orfeu Flores

Gerentes, STAB VIDA Apt.89 - St.António de Oeiras, 2781-601 Oeiras, <http://www.stabvida.com>, sofiagoes@stabvida.com

STAB VIDA – Uma Empresa Portuguesa de Investigação e Serviços em Biologia Molecular e Biotecnologia

A Biotecnologia, a indústria mais dinâmica do século XXI, é uma força que se encontra actualmente posicionada para mudar, virtualmente, todas as indústrias que intersecta. Desde a saúde, o ambiente até aos químicos e processos de produção, da descoberta de medicamentos a aplicações da nanotecnologia, a Biotecnologia está a criar plataformas diversas para novos produtos, serviços e mercados: novos métodos de diagnóstico, aparelhos de auto-regulação, medicinas inteligentes (na sua habilidade de se adaptarem ao tamanho, peso e metabolismo do organismo), culturas de cultivo para uma população crescente, a cultivar numa área finita de terra arável, entre outros.

A STAB VIDA é uma empresa do GRUPO STAB dedicada ao desenvolvimento e comercialização de produtos e serviços na área da Biologia Molecular, Biotecnologia, Saúde e Ambiente. A STAB Vida surgiu em meados de 2000 quando, na sequência da expansão das linhas de negócio da então STAB Tratamento de Águas e Biotecnologia Lda., foi criado o GRUPO STAB.

A STAB VIDA iniciou a sua actividade direccionada para o desenvolvimento de métodos de detecção de leveduras contaminantes em alimentos, tendo mais tarde alargado a sua actividade à prestação de serviços, nomeadamente na área da Biologia Molecular para as áreas da Biotecnologia, Saúde e Ambiente. Para além de colaborar em projectos de investigação e desenvolvimento nacionais e internacionais, a STAB VIDA desenvolve e patenteia produtos e tecnologias de interesse na área da biotecnologia e biomedicina.

A STAB Vida posiciona-se na Biotecnologia, Saúde e Ambiente nas áreas do prognóstico, diagnóstico e terapia, investindo ainda em ferramentas auxiliares derivadas da bioinformática e usando, ainda, a capacidade adquirida para a prestação de serviços, sobretudo na área da Biologia Molecular.

A sua missão consiste em potenciar a inovação e a adopção de novas tecnologias em Biotecnologia, Saúde e Ambiente através de investigação e desenvolvimento, transferência de tecnologia a partir do conhecimento gerado em universidades, institutos de investigação, e em promover a comercialização de produtos e serviços próprios no mercado global.

As Áreas de Actividade da STAB VIDA

Investigação em Biologia Molecular

A área de investigação e desenvolvimento em biologia molecular está vocacionada para a investigação e desenvolvimento de produtos e tecnologias de interesse na área da biotecnologia e biomedicina. Um grande número dos projectos desta área é desenvolvido em consórcio com universidades e institutos de investigação nacionais e europeus no âmbito de projectos da Agência da Inovação (ADI) e da União Europeia. Esta área é a área de maior investimento da STAB VIDA, e será a partir dela que a longo prazo se irão desenvolver os produtos de maior valor acrescentado.

Métodos de Detecção de Leveduras Contaminantes em Alimentos - SPYI

Esta linha de investigação e desenvolvimento dedica-se ao desenvolvimento e comercialização de métodos inovadores para a detecção de leveduras patogénicas contaminantes de produtos alimentares.

Na última década tem-se verificado o aumento do nível de deterioração de alimentos devido à proliferação de leveduras nas indústrias alimentar e de bebidas. As exigências dos consumidores para processos de conservação mais suaves (menos sal, açúcar, ácidos, tratamento térmico, etc.) tem suscitado novos episódios de deterioração por leveduras. Além disso, vários produtos alimentares nos quais se desconhecia que as leveduras pudessem ter um papel negativo, como é o caso do queijo e da carne, têm sido frequentemente encontrados com problemas de contaminação por leveduras.

O objectivo principal desta linha é fornecer às indústrias dos sectores alimentar e das bebidas, assim como aos laboratórios de diagnóstico clínicos, métodos rápidos, sensíveis e económicos de atempada detecção, identificação e quantificação de leveduras contaminantes de alimentos que estejam prestes a entrar na cadeia alimentar, permitindo assim um controlo e monitorização eficientes.

A STAB VIDA tem actualmente seis meios de cultura sob protecção de patente para a rápida detecção e identificação de várias leveduras patogénicas deterioradoras de alimentos.

Serviços de Biologia Molecular – STAB Genómica

A área dos serviços de biologia molecular da STAB VIDA consiste numa plataforma de serviços direccionada para a realização de trabalhos específicos de sequenciação de DNA, genotipagem, microarrays de DNA e detecção de *Legionella pneumophila*. Estes serviços têm aplicação tanto nas áreas da investigação das ciências da vida e da saúde como nas áreas do ambiente e do controlo da qualidade do ar.

Actualmente é a área dos serviços de biologia molecular, que suporta grande parte das actividades da STAB VIDA.

Serviços de Sequenciação de DNA

A sequenciação de DNA consiste na determinação precisa da sequência de nucleótidos numa amostra de DNA. A aquisição da informação genética tornou-se hoje em dia indispensável para muitas aplicações biotecnológicas, sendo importante para uma melhor compreensão da vida e dos mecanismos biológicos.

Os serviços de sequenciação de DNA da STAB compreendem: Sequenciação de DNA, Electroforese Capilar e Primer Walking. Todos os serviços de sequenciação da STAB VIDA são desenvolvidos em sequenciadores automáticos de DNA por electroforese capilar.

Sequenciação de DNA

Para plasmídeos, produtos de PCR, cosmídeos, fagos e BACs
Leituras até 700 bp

Electroforese Capilar

Leituras até 700 bp
Electroforese de fragmentos de DNA sequenciados

Primer Walking

Sequenciação de fragmentos de DNA até 15 Kb

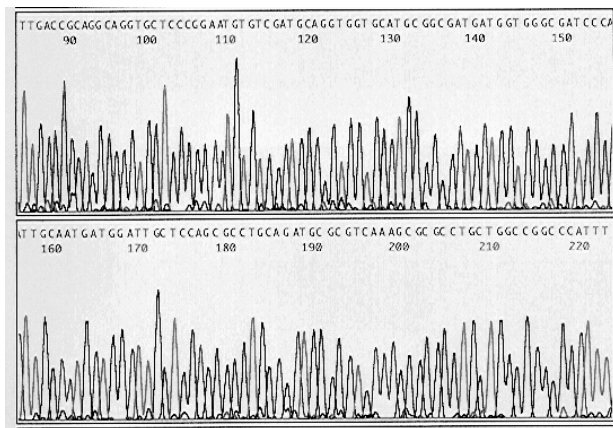


Figura 1 – Fluorograma da reacção de sequenciação de um fragmento de DNA

Serviços de Genotipagem

As técnicas de análise de fragmentos de DNA ou Genotipagem permitem a identificação de organismos com base nas diferenças entre as suas sequências genómicas. *Loci* específicos no genoma são investigados e usados para definir o genótipo desse organismo.

Actualmente, as técnicas mais sofisticadas para a análise de fragmentos baseiam-se na amplificação por PCR de regiões polimórficas específicas do genoma. Estes métodos têm tido uma vasta aplicação em diversas áreas: mapeamento genético de animais, plantas e microorganismos, estudos filogenéticos, diagnósticos médicos e medicina forense.

Os serviços de Genotipagem da STAB VIDA compreendem: análises de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) e Microsatélites.

AFLP – Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos Amplificados

A análise de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos Amplificados (AFLP) é um dos métodos mais robustos para a análise aleatória de vários *loci* em amostras de DNA. A análise de AFLP inclui: a digestão de DNA genómico utilizando endonucleases de restrição específicas; a ligação de adaptadores específicos às extremidades de alguns fragmentos de restrição; a amplificação desses fragmentos de restrição utilizando primers marcados específicos para os adaptadores e a separação e análise dos fragmentos amplificados por electroforese capilar.

Microsatélites

Os marcadores STR (Short Tandem Repeat), também chamados Microsatélites, são regiões de DNA que incluem um número variável de sequências repetitivas consecutivas de 2 a 6 pares de bases. Estas regiões de DNA são os marcadores de eleição para diagnósticos genéticos, sendo cada vez mais usados em outras áreas como a genética de populações, a análise de relações e o mapeamento genético. Os Microsatélites apresentam algumas características dese-

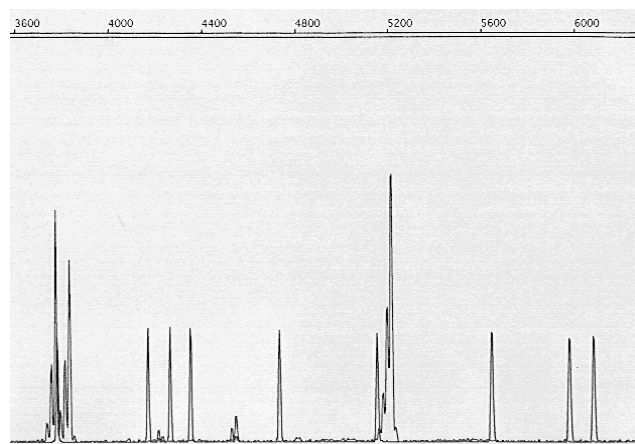


Figura 2 – Fluorograma da análise de fragmentos de DNA por AFLP

jáveis: podem ser encontrados em número relativamente elevado e estão distribuídos regularmente ao longo de muitas regiões do DNA genómico. Além disso, apresentam um grau elevado de heterozigotia. Na STAB VIDA, a análise de Microsatélites é efectuada por amplificação em PCR de *loci* específicos utilizando primers marcados com marcadores fluorescentes. Os fragmentos amplificados são depois separados por electroforese capilar e identificados através da emissão de fluorescência. Tecnicamente, os Microsatélites oferecem diversas vantagens: o seu reduzido tamanho permite a co-amplificação de diferentes *loci* num unico PCR; tem tamanhos discretos, permitindo assim uma facil interpretação dos

Serviços de Microarrays

Os microarrays de DNA são pequenos dispositivos sobre os quais se depositam milhares de fragmentos de DNA para a realização de ensaios de complementaridade em paralelo, num único passo. Os microarrays têm sido aplicados numa grande diversidade de estudos, nomeadamente sempre que é importante evidenciar diferenças na expressão genética entre células oriundas de diferentes condições ou em diferentes estados de desenvolvimento.

Actualmente a tecnologia de microarrays está presente em muitos trabalhos de investigação na área da genética relacionados com a análise comparativa de genomas (resposta global da expressão genética em condições de stress, a uma mutação, em diferentes fases de desenvolvimento da célula,

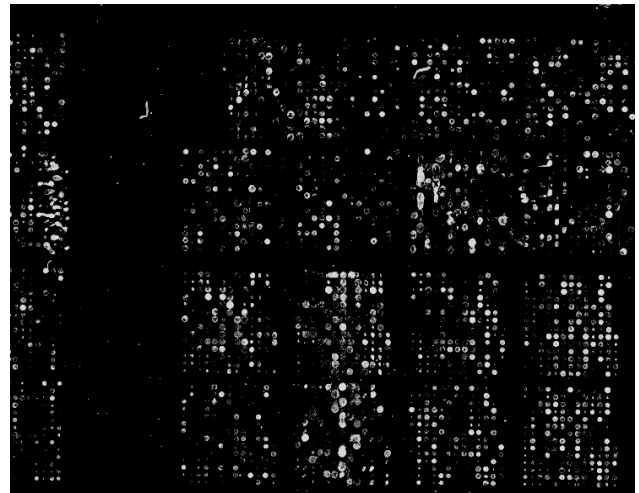


Figura 3 - Imagem de um microarray de DNA hibridado

etc.), genotipagem, detecção de mutações/polimorfismos, nomeadamente em estudos de Polimorfismo de um Único Nucleótido (ou Single Nucleotide Polymorphism, SNP), rastreio de microorganismos patogénicos, farmacogenómica, toxicogenómica, estudo do cancro entre outros.

Os serviços de microarrays da STAB VIDA incluem: a síntese e marcação de DNA, a hibridação do Chip e o scanning e análise dos resultados.

Serviços de detecção de *Legionella pneumophila*

A bactéria *Legionella pneumophila* é a causadora da Legionelose uma forma de pneumonia que em muitos casos se pode revelar fatal. Esta bactéria foi identificada pela primeira vez em 1977, pelo Centre of Disease Control nos Estados Unidos, como causa de 34 mortes ocorridas na Convenção da Legião Americana, decorrida no ano anterior, em Filadélfia. Alguns dias após a Convenção, cerca de 220 pessoas adoeceram gravemente, com manifestações semelhantes às da pneumonia. A *L.pneumophila* está largamente distri-



Figura 4 - Laboratório de detecção de *L.pneumophila* da STAB VIDA

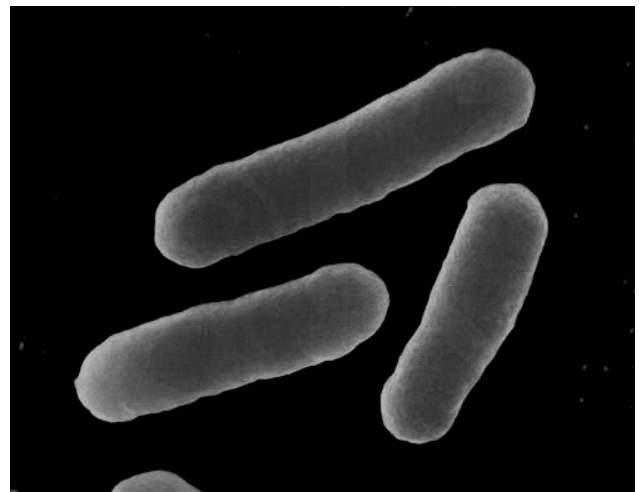


Figura 5 - *Legionella pneumophila*

buída em sistemas de águas e de ar condicionados. Níveis quase indetectáveis de *Legionella* podem facilmente colonizar estes sistemas e crescer para concentrações elevadas. Enquanto que no seu ambiente natural, rios, lagos e lagoas, a sua concentração é dificilmente superior a 10 células por litro, nos sistemas de águas e de ar condicionado esta pode facilmente chegar às 10⁶ células por litro. Nestes tipos de ambientes, é comum a formação de pequenas gotículas que, arrastadas pela deslocação de ar, podem facilmente dirigir-se aos pulmões e aí originar Legioneloses. Nos últimos anos a *L.pneumophila* tem vindo a constituir um grave problema para a saúde pública.

Os serviços de detecção da *L.pneumophila* da STAB VIDA baseiam-se num método desenvolvido *in house* para a detecção desta bactéria. Este método consiste num *nested* PCR de um gene exclusivo da espécie *L.pneumophila*. Este método permite a monitorização eficaz, rápida, sensível e altamente específica, de todos os serogrupos 1-14 de *Legionella pneumophila* em 48h. Actualmente a STAB VIDA está a acreditar o seu laboratório para a realização deste ensaio segundo a norma ISO:17025.

Desafios à Criação e Implementação de uma Empresa Portuguesa de Investigação e Serviços em Biologia Molecular

As oportunidades

O aparecimento nos últimos anos da genómica funcional e da proteómica funcional permitiu que a investigação científica e clínica desse um salto quântico. Da análise de um gene uma função passou a fazer-se a análise integrada da expressão genética e proteica de um organismo, de um determinado tecido ou de uma determinada patologia no seu todo, o que permitiu, que em poucos anos, a investigação nas áreas da ciência da vida evoluísse a uma velocidade nunca antes vista. Na base desta evolução têm estado, entre outros, o aparecimento de tecnologias e equipamentos altamente sofisticados e automatizados como são as técnicas de sequenciação automática, os microarrays de DNAs e as poderosas ferramentas de bioinformática para o processamento do crescente número de dados produzidos por estas tecnologias.

Se por um lado esta evolução permite acelerar o processo da investigação científica, por outro lado ela exige cada vez mais a aquisição de equipamento de custo muito elevado para os laboratórios. Não havendo orçamentos ilimitados, os investimentos dos laboratórios das universidades e centros de investigação têm que ser canalizados para a aquisição dos equipamentos essenciais à realização dos trabalhos

nucleares de cada grupo e não podem ser canalizados para equipamentos que realizem tarefas necessárias mas acessórias à investigação desse grupo.

Surge assim a oportunidade para a criação de uma plataforma de serviços em biologia molecular, que podem ser contratados pelos vários laboratórios e grupos de investigação, reduzindo assim os seus custos de investimento em equipamento e reagentes.

Em 2000, data da criação da STAB VIDA, não existia nenhuma plataforma de serviços deste tipo em Portugal. Havia portanto uma oportunidade para uma pequena empresa portuguesa de biotecnologia.

As dificuldades

Embora à data da sua criação a STAB VIDA não tivesse concorrentes nacionais, muitos dos serviços que se propunha vir a desenvolver já eram prestados por empresas estrangeiras. Não havendo em Portugal muitas empresas de base tecnológica, e estas empresas não tendo uma grande expressão, a implementação de uma plataforma de serviços de biologia molecular de uma empresa de biotecnologia portuguesa não era óbvia.

As vantagens da STAB VIDA

O grande conhecimento do mercado científico e clínico nacional, o facto de ter os seus laboratórios equipados com equipamento altamente sofisticado, o poder contar com uma equipa técnica altamente qualificada (50% de doutorados em biologia molecular) e muito motivada, que consegue para além da execução dos serviços prestar um apoio personalizado aos clientes ao longo de todo o processo, assim como a participação de capital de risco na empresa (Caixa Banco de Investimentos e PME Capital) foram alguns dos factores que permitiram à STAB VIDA fazer frente a estas dificuldades e implementar-se no mercado português.

Ao longo dos três últimos anos a STAB VIDA tem vindo a implementar a sua linha de serviços de biologia molecular no mercado nacional tanto junto de hospitais, clínicas, centros de investigação e universidades de todo o país, como junto de empresas de manutenção e limpeza de sistemas de águas e de ar condicionado.

No futuro a STAB VIDA espera conseguir não só alargar a sua base de clientes em Portugal, como também levar a sua linha de serviços de biologia molecular além-fronteiras, junto dos principais centros de investigação europeus nas áreas da biotecnologia e da saúde.