II Workshop de Biotecnologia

5 anos de Biotecnologia na UA

18 de Maio

Livro de Resumos

2011

2workshopbiotecnologiaua.weebly.com
2workshopbiotec@gmail.com

dqua universidade de aveiro
universidade de aveiro departamento de biologia
d:bio
universidade de aveiro
AAUAv
BEST AVEIRO

Índice

5 Anos do Curso de Biotecnologia na UA 1

1) Caracterização de bactérias hidrocarbonoclásticas produtoras de biossurfactantes da ria de aveiro 2

2) Evaluation of the significant effects of ionic liquids towards CaLB (*Candida antarctica* lipase B) activity 3

3) Relaxometric studies of hybrid nanoparticles as potential contrast agents for MRI and optical imaging 4

4) Testing of a β–galactosidase reporter system for the in vivo study of codon context effects on translation 5

5) Produção de biossurfactantes utilizando sub-produtos industriais 6

6) Desenvolvimento de resistência à inactivação por alta pressão em *Salmonella typhimurium* ... 7

7) Terapia Fágica como Alternativa de Baixo Impacto Ambiental para Inactivar Bactérias Patogénicas em Pisciculturas. 8

8) Effect of Thermal and Sequentially Combined Pressure/Thermal Treatments on Inhibition of Potato Tubers Sprouting 9

9) Efeito de alta pressão a 20ºC na ligação de água e nas isotérmicas de sorção de amido de milho 10

10) The combined effect of high pressure and temperature on V_{max} and K_M of the enzyme horseradish peroxidase 11

11) Biorrefinaria: valorização de subprodutos da indústria papeleira para produção de proteína microbiana (SCP) 12

13) Effect of High Pressure on the enzymatic hydrolysis of carboxymethyl cellulose 14

14) Biodegradability studies of materials from renewable sources 15

15) Estratégias de preparação e modificação de nanopartículas de Au para utilização em bio-sensores 16

16) Aplicação de uma porfirina catiónica na inactivação fotodinâmica de um biofilme bacteriano 17

17) Environmentally friendly molecular structures 18

18) Walnut shell valorization in the removal of bisphenol-A from water 19

19) Aplicação de um método rápido de detecção bacteriana para avaliar a eficácia da terapia fágica como alternativa para inactivar bactérias patogénicas em pisciculturas. 20

20) (Eco)toxicity of ionic liquids towards to freshwater green algae (Pseudokirchneriella subcapitata and Chlorella vulgaris) 21

21) Partition of bovine serum albumin in ionic liquid based aqueous two-phase systems 22

22) Study of the major effects of ionic liquids towards the enzymatic activity and stability of Candida antarctica lipase B 23

23) Effect of high hydrostatic pressure on flavonoids extraction from (*Humulus lupulus* L.) hops . 24

24) Valorisation of industrial by-products into volatile fatty acis (VFA) by anaerobic digestion 25

25) Comparação da fermentação de HSSL com *Pichia stipitis* em cultura suspensão vs. cultura imobilizada para a produção de bioetanol de segunda geração 26

26) Selection of PHA-producing organisms using a by-product of pulp industry 27

27) Efeito do processamento por alta pressão nas propriedades funcionais de isolados de proteína de soja comerciais e suas misturas com goma de alfarroba..... 29

28) Purification and characterization of a recombinant histidine-tagged microbial collagenase ... 30

29) Toxicity of Ionic Liquids towards Vibrio fischeri..... 31

30) Estudo de interacções ao nível molecular de nanopartículas com modelos de membrana celular..... 32

31) Produção de fibras poliméricas por electrofiação utilizando líquidos iónicos 33

5 Anos do Curso de Biotecnologia na UA

O II workshop de Biotecnologia visa marcar os 5 anos de ensino formal de Biotecnologia na UA com o início do Licenciatura em Biotecnologia. Organizado pela Direcção de Curso da Licenciatura e a Comissão Científica do Mestrado em Biotecnologia, este workshop subordinado ao tema "5 anos de Biotecnologia na UA", tem como finalidade agregar todos os intervenientes principais na área da Biotecnologia na UA, ao nível de ensino e investigação, no sentido de poder mostrar um pouco da Biotecnologia que se faz na UA.

Espera-se que este workshop possa servir de reflexão e estímulo para o desenvolvimento da Biotecnologia na UA, numa perspectiva e dinâmica multidepartamental e multifacetada, com um cariz muito aberto ao exterior e forte pendor industrial.

O II Workshop conta com a colaboração do BEST Aveiro e do Núcleo de Estudantes de Química da AAUAV.

A Direcção de Curso da Licenciatura e a Comissão Científica do Mestrado em Biotecnologia

1) Caracterização de bactérias hidrocarbonoclásticas produtoras de biossurfactantes da ria de aveiro

Patrícia M. Domingues, António Louvado, Francisco Coelho, Ana L. Santos, Newton C. M. Gomes, Adelaide Almeida, Ângela Cunha

CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

A biorremediação é tida como uma possível estratégia na recuperação de ecossistemas contaminados com hidrocarbonetos. A aplicação eficaz desta tecnologia é, no entanto, muitas vezes limitada pela natureza hidrofóbica dos contaminantes.[1] O recurso a estirpes bacterianas simultaneamente degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biosurfactantes apresenta um enorme potencial na reciclagem de compostos hidrofóbicos. Assim, tem sido objectivo do nosso grupo de trabalho, avaliar o potencial biotecnológico do sistema estuarino da Ria de Aveiro quanto à presença de bactérias hidrocarbonoclásticas produtoras de biossurfactantes.

Estudos preliminares em isolados de culturas de enriquecimento da microcamada superficial marinha (SML) com surfactantes sintéticos permitiram obter 5 isolados cuja produção de biossurfactante foi demonstrada em cultura através do método "*atomized oil*".[2] A sequenciação do gene codificante do 16S rRNA destes 5 isolados revelou a afiliação dos mesmos ao género *Pseudomonas*, que tem sido documentado como produtor de biosurfactantes.[3]

No seguimento deste trabalho, estão em curso experiências em meios selectivos (diesel, crude e parafina) a partir de inóculos de diferentes matrizes ambientais: amostras de SML, sedimentos estuarinos e rizosedimentos de bancos de *Halimione portulacoides*, uma planta halófita dos sapais da Ria de Aveiro. Desta forma, pretende-se optimizar as condições experimentais para o isolamento selectivo de bactérias hidrocarbonoclásticas produtoras de biossurfactantes e obter uma colecção de estirpes que, depois de caracterizadas do ponto de vista fisiológico e genético, poderão revelar-se como promissoras no processo de biorremediação de regiões estuarinas e costeiras após contaminação acidental com hidrocarbonetos de petróleo.

Referências:

(1) Okoh, A.I. Biotechnology and Molecular Biology Review, 2006, 1, 38.
(2) Burch, A.Y., et al. Appl. Environ. Microbiol., 2010, 76.
(3) Desai, J.D., I.M. Banat Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61.

2) Evaluation of the significant effects of ionic liquids towards CaLB (*Candida antarctica* lipase B) activity

L. D. F Santos, S. P. M. Ventura, J. A. P. Coutinho

CICECO, Chemistry Department, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Enzymes have found great uses in several industries such as food, pharmaceutical, detergent, textile, pulp and paper, animal feed, leather and cosmetics [1]. In nature, enzymes act as catalysts of living systems and are designed to function in aqueous solutions. However, anhydrous conditions are needed for synthetic transformations using these macromolecules. The use of organic solvents as non-aqueous environments offers the possibility of carrying out synthetic reactions by hydrolytic enzymes, increasing the solubility of molecular substrates [2]. However, biocatalysts in non-aqueous media often suffer from reduction of activity, selectivity and/or stability[3]. In addition, conventional organic solvents present high volatility and flammability being harmful to the environment [4]. The use of ionic liquids (ILs) in biocatalytic processes has recently gained much attention as an environmentally attractive alternative to classical organic solvents. They have been seen as good solvents in a wide variety of biochemical processes, because they can improve enzyme stability, substrate and/or product selectivity and also are responsible for the suppression of some side reactions [5].

The main idea of this work was to provide some information about the influence of several imidazolium- based ILs in the activity of CaLB (lipase B from *Candida antarctica*). Parameters such as the IL concentration, the effect of different anions and distinct alkyl chain lengths were considered in this study. This cation core was used to study the effect of different anions and also the effect of the elongation of the alkyl chain (C2 to C10). The studied anions were bromide Br, dicyanamide [$N(CN)_2$], hydrogenosulphate [HSO_4], methanesulfonate [CH_3SO_3], triflate [CF_3SO_3], acetate [CH_3COO], trifluoracetate [CF_3COO] and chloride Cl. The enzyme activity was assayed spectrophotometrically.

The main conclusion of the present work is that the enzymatic activity was affect by all the parameters studied. In terms of the effects of the different anions, these results indicate [HSO_4] as the responsible for the major negative effects and Br as the responsible for the smaller decrease. The influence of different concentrations was also studied being proved that this parameter has a major role in the effects of alkyl chain in the enzymatic activity.

Acknowledgments

A sincere acknowledge to Sr. Armindo Ribeiro Gaspar, who kindly provided the enzyme CaLB used in this study.

References

(1) (a) Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology 2004, 118, 155(b) Soetan, K. O.; Aiyelaagbe, O. O.; Olaiya, C. O. African Journal of Biotechnology 2010, 9, 382.

(2) Wang, L.; Chen, Y. Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology 2009, 25, 1789.

(3) (a) Gorman, L. A. S.; Dordick, J. S. Biotechnology and Bioengineering 1992, 39, 392(b) Trodler, P.; Pleiss, J. BMC Structural Biology 2008, 8.

(4) Lancaster, M. GREEN CHEMISTRY An Introductory Text; 2nd ed.; Royal Society of Chemistry, 2010.

(5) Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Chemical Reviews 2007, 107, 2757.

3) Relaxometric studies of hybrid nanoparticles as potential contrast agents for MRI and optical imaging

Sonia Pinho,[1, 2] Carlos F.G.C. Geraldes,[3] Henrique Faneca,[4] João Rocha,[1] Luis Carlos,[1] Marie-Hélène Delville[2]

[1]*Department of Chemistry/Physics & CICECO, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal*
[2]*Bordeaux Institute of Condensed Matter Chemistry, UPR CNRS 9048 / University of Sciences and Technology of Bordeaux,, 33608 Pessac, France.*
[3]*Department of Biochemistry, Faculty of Science and Technology, and Center of Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra, 3001-401 Coimbra, Portugal*
[4]*Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, 3001-401 Coimbra, Portugal*

Magnetic Resonance Imaging (MRI) is one of the most powerful non-invasive diagnostic tools used in medicine. Paramagnetic chelates containing a lanthanide ion, namely gadolinium (III), are generally used as contrast agents (CAs). CAs based on lanthanides complexes used for in vivo MRI measurements has a full body distribution, decreasing their concentration within the vicinity of a targeted site. Their administration requires the injection of very high amounts of CA. We have been interested in the synthesis of new contrast agents containing inorganic nanoparticles able to complex lanthanide chelates. This has the following advantages: (i) locally increases the CA concentration, (ii) significantly increases the degree of contrast in T1, as shown by preliminary tests [1] and (iii) affords bifunctional nanoparticles for MRI and optical imaging [2].

Our aim is to combine in the same particle, relaxivity, optical and targeting agents, in order to have a strong potential for specific recognition of certain tissues or organs. Tissue specificity will improve the clinical diagnosis and decrease the amount of CA used, since the concentration of CA close to the target will increase. The nanoparticles we are looking at are of the type hybrid inorganic-organic SiO_2@APS core-corona. Lanthanide chelates, for their magnetism (MRI) or luminescence properties, are grafted onto these particles and their properties are studied. Subsequently, these nanoparticles are internalised in living cells (fig.1).

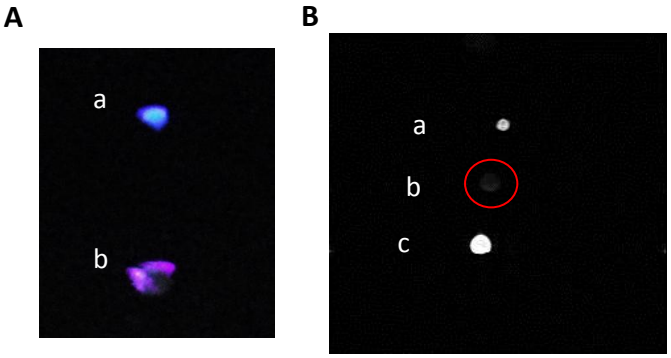


Figure 1:A) Photograph image of cellular pellet containing (a) no NP incorporation (control) (b) SiO_2@APS/DTPA:EuGd incorporation; B) MRI image of cellular pellet containing (a) no NP incorporation (control) (b) T2 NP incorporation and (c) SiO2@APS/DTPA:Gd incorporation.

Acknowledgments
This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), , the CNRS France, the Région Aquitaine France, FEDER, COST Action D38 "Metal-Based systems for Molecular Imaging Applications", the European Network of Excellence FAME and the Portuguese National NMR Network (RNRMN.

References

(1) Voisin, P.; Ribot, E.; Miraux, S.; Bouzier-Sore, A-K; Lahitte, J-F; Bouchaud, V.; Mornet, S.; Thiaudiere, E.; Franconi, J-M; Raison, L.; Labrugere, C.; Delville, M-H. *Bioconjugate Chemistry 18(4) (2007), 1053-1063.*
(2) Yu, Shi-Yong; Zhang, Hong-Jie; Yu, Jiang-Bo; Wang, Cheng; Sun, Li-Ning; Shi, Wei-Dong. *Langmuir 23 (2007), 7836-7840.*

4) Testing of a β–galactosidase reporter system for the in vivo study of codon context effects on translation

Fernandes* J., Frommlet J., Moura G., Santos M.
Department of Biology, University of Aveiro, Portugal
*joanapfernandes@ua.pt

Department of Biology, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Studies in a large number of organisms have shown that codon context - the association of two consecutive codons - is not random and the current data suggest that codon context has a major effect on translational efficiency and decoding accuracy. However, these effects of codon context on translation are mainly inferred based on bioinformatics analyses and verification of these data in biological systems is still poor. This is largely due to the fact that only few suitable reporter systems are available. For example, misincorporation of amino acids at specific codon-pairs has previously been determined using luciferase-based reporter assays but these assays are limited to a small number of codon combinations present in the active site of luciferase. The here presented work had the aim to establish a novel reporter system for the testing of codon context-effects on translation accuracy and efficiency in vivo. As reporter, the E. coli enzyme β–galactosidase (β-gal) was chosen. By means of a strain/vector system that permitted restoration of β–gal activity through α-complementation, the effects of a context de-optimized lacZα gene on the heat stability of the β–gal was tested. This assay design was based on the working hypothesis that if context de-optimization increases the number of misincorporated amino acids in the lacZα gene product, then the heat stability of the β–gal should be measurably decreased. Quantified were changes in heat stability by a functional β-gal assay, using ONPG as substrate and colorimetric measuring of the product o-nitrophenol. Further, we purified the histidin-tagged lacZα unit and subjected it to mass spectrometry in order to gain more specific information on the site specific misincorporation of amino acids.

Acknowledgments
Thanks are due to all the people from the RNA biology laboratory - Department of Biology.

5) Produção de biossurfactantes utilizando sub-produtos industriais

A.C.G. Martins[1], M. S. Alves[1], Á.S. Lima[2], J.A.P. Coutinho[1], L. S. Serafim[1]

[1]*CICECO, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193Aveiro, Portugal*
[2]*Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia, Aracaju-SE, Brasil.* **luisa.serafim@ua.pt**

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, compostas por uma parte hidrofóbica (apolar) e outra hidrofílica (polar), o que lhes confere a capacidade de redução da tensão superficial e interfacial, bem como a formação de emulsões em fluidos. As suas propriedades tornam estes compostos aplicáveis em diversas áreas de acção.

Microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras, podem sintetizar sub-produtos metabólicos com capacidade tensioactiva, biossurfactantes, especialmente quando são fornecidos substratos imiscíveis com a água. Os biossurfactantes apresentam as seguintes vantagens em relação aos surfactantes químicos: baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e ampla faixa de pH e temperatura. Estas características permitem a sua aplicação em diversas áreas, desde a agricultura, saúde, produtos alimentares e ainda protecção ambiental. Os biossurfactantes variam na sua natureza, tamanho e propriedades dependendo dos microrganismos produtores e além disso cada classe de biossurfactantes tem áreas específicas de aplicação. Ramnolípidos, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa,* surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* e soforolípidos, produzidos por *Candida bombicola* são exemplos de classes de biossurfactantes. No entanto, a produção biológica de surfactantes tem um custo elevado. Uma alternativa para redução do custo de produção é a utilização de sub-produtos industriais e a selecção dos microrganismos aptos à utilização destes substratos.

No presente estudo pretende-se avaliar a capacidade de estirpes bacterianas, isoladas *in situ* no Brasil num processo de bio-remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos, para a produção de biossurfactantes a partir de óleo extraído de borra de café. Na preparação do café, uma das bebidas mais consumidas mundialmente, após a extracção, o pó utilizado é rejeitado e passa a ser denominado borra de café. Este sub-produto após o processo anteriormente referido é ainda rico em hidratos de carbono e lípidos, além disso é obtido em grandes quantidades. A borra de café considera-se assim como substrato para processos de bioprodução. O óleo de café utilizado neste trabalho foi caracterizado, após extracção, e a quatro estirpes bacterianas de forma a avaliar a sua capacidade de produção de biossurfactantes e seleccionadas as mais capazes. Na avaliação foram também considerados parâmetros como o consumo da fonte de carbono, de azoto, razão entre C/N e pH. Finalmente caracterizaram-se as classes de biossurfactantes produzidas.

Bibliografia

Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. (2002). "An update on the use of unconvencional substrates for biosurfactant production and their new applications." Appl. Microbiol. Biotechnol. **58**: 428 - 434.
Nitschke, M. and Pastore, G. M. (2002). "Biossurfactantes: propriedades e aplicações." Quim. Nova 25(5): 772 - 776.
Couto, R. M. and Fernandes, J. (2009). "Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds." The Journal of Supercritical Fluids **51**: 159 - 166.

6) Desenvolvimento de resistência à inactivação por alta pressão em *Salmonella typhimurium*

Adriana Reis[2], Liliana Fidalgo[3], Adelaide Almeida[1,2], Newton C.M. Gomes[1,2], Ângela Cunha[1,2], Jorge A. Saraiva[3]

CESAM[1], Departamento de Biologia[2] e Departamento de Química[3], Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

A inactivação de microrganismos através do processamento de alimentos por alta pressão na indústria alimentar inovou alguns nichos do mercado e revitalizou indústrias mais tradicionais[1]. Uma vez que é uma técnica recente, são ainda escassos os estudos de avaliação do risco de desenvolvimento de resistência microbiana ao tratamento[2]. No entanto, este é um aspecto de grande relevância para a aplicação industrial do tratamento por alta pressão, sobretudo quando estão envolvidos ciclos sucessivos de inactivação microbiana por pressurização.

O objectivo deste trabalho foi a avaliação do desenvolvimento de resistência em *Salmonella typhimurium* sujeita a ciclos repetidos de pressurização.

Culturas de células foram sujeitas a ciclos de pressão, 350MPa e 400MPa, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A cultura inactivada em cada ciclo foi usada como inóculo para a cultura sujeita ao ciclo de pressurização seguinte. Após crescimento, as novas culturas foram mantidas no frio até à pressurização. A inactivação microbiana foi quantificada pela redução do teor de microrganismos viáveis (UFC mL^{-1}) avaliado por sementeira em meio sólido e contagem de colónias. Foram realizados 13 ciclos de inactivação a 350MPa e 16 ciclos a 400MPa. No sentido de avaliar a alteração genética da população, as culturas usadas nos diferentes ciclos foram sujeitas a tipagem molecular (BOX-PCR)[3].

O primeiro ciclo de inactivação causou uma redução de 2,9 e 5,7 log com 350MPa e 400MPa, respectivamente. Entre o segundo e o quinto ciclos de pressurização, as reduções foram de 0,9 a 1,1 log com 350 MPa de 1,2 a 1,9 log com 400 MPa, demonstrando um aumento imediato de resistência na população sobrevivente ao primeiro ciclo de pressurização. Entre o sexto e o oitavo ciclos verificou-se uma recuperação parcial da susceptibilidade (reduções de 2,3 a 3,2 log a 350 MPa de 2,8 a 3,4 log a 400 MPa) e um novo aumento da resistência, sem sinais de recuperação da susceptibilidade nos ciclos seguintes.

A análise molecular não revelou diferenças significativas entre as várias populações bacterianas indicando uma adaptação fisiológica da população e não uma alteração genética.

Os resultados demonstram que é possível o desenvolvimento de resistência à pressurização em populações bacterianas expostas a ciclos de inactivação sucessivos, o que numa perspectiva da segurança alimentar, tem implicações na aplicação industrial desta tecnologia. Estes resultados poderão ter importantes aplicações biotecnológicas.

Agradecimentos

Aos meus orientadores e colegas dos laboratórios LMAA e LEMAM do Departamento de Biologia e aos colegas do Under Pressure Lab do departamento de Química

Referências

1) Yuste, J.; Capellas, M.; Pla, R.; Fung, D.Y.C.; Mor-Mur, M. *J of Rapid Met. and Auto. in Microb.* **2001**, 9, 1.
2) Garcia-Gonzalez, L.; Rajkovic, A.; Geeraerd, A.H.; Elst, K.; Van Ginneken, L.; Van Impe; J.F.; Devlieghere, F.; *Letters in Ap. Microb.* **2010**, 50, 653.
3) Rademaker, J.; Hoste, B.; Louws, F.; Kersters, K.; Swings, J.; Vauterin, L.; Vauterin, P.; de Bruijn, F. **2000**, *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 665.

7) Terapia Fágica como Alternativa de Baixo Impacto Ambiental para Inactivar Bactérias Patogénicas em Pisciculturas.

Carla Pereira, Yolanda J. Silva, Ângela Cunha, Newton C. M. Gomes e Adelaide Almeida

Departamento de Biologia &CESAM, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

A importância crescente da cultura de organismos aquáticos a nível mundial, de forma a compensar a progressiva redução das populações naturais de peixes, contribuiu para que a aquacultura se tornasse num dos sectores agrícolas com crescimento mais rápido, fornecendo praticamente um terço das fontes de marisco a nível mundial.[1] Contudo, esta indústria sofre, frequentemente, grandes perdas económicas devido a infecções causadas por microrganismos patogénicos.[1] As doenças bacterianas constituem um importante problema na expansão da indústria de aquacultura. O objectivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade da terapia fágica na inactivação de bactérias patogénicas de peixes numa piscicultura semi-intensiva da Ria de Aveiro. Para tal, caracterizou-se a densidade das principais bactérias patogénicas dos peixes; a dinâmica sazonal destas bactérias; a sobrevivência dos fagos específicos isolados a partir das bactérias patogénicas; a especificidade destes fagos e o impacto ecológico da terapia fágica sobre a estrutura das comunidades bacterianas naturais.

Os resultados mostraram que a estrutura da comunidade bacteriana variou sazonalmente; que o espectro de infecção dos fagos testados variou desde especificidade apenas para o hospedeiro até especificidade para bactérias de diferentes famílias; que a sobrevivência destes fagos na água da aquacultura variou entre 15 dias e 3 meses e que a adição dos fagos à comunidade bacteriana não provocou variação significativa na sua estrutura.

Em conclusão, a terapia fágica poderá ser uma opção de baixo impacto ecológico no processo de desinfecção de águas piscícolas. Convém referir que, como a estrutura da comunidade bacteriana varia sazonalmente, é necessário ter em conta este facto aquando da selecção dos fagos a usar na estratégia terapêutica.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), por fundos da FEDER através do COMPETE (Programa Operacional Factores de Competividade) e pela FCT (Fundação a Ciência e Tecnologia), no âmbito do projecto de investigação FCOMP-01-0124-FEDER-007378. A bolsa de PhD de Yolanda J. Silva Santos foi suportada pela FCT (SFRH/BD/31827/2006).

Referências

(1) Flegel, T.W. *Aquaculture*. **2006,** *258*, 1-33.

8) Effect of Thermal and Sequentially Combined Pressure/Thermal Treatments on Inhibition of Potato Tubers Sprouting

Jorge Alexandre Saraiva[1], Ivo Manuel Rodrigues[2], Sandra Tavares Pinheiro[1], Natália Dias Jorge[1]

1 - Department of Chemistry, Unit Research of Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-alimentares, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal. jorgesaraiva@ua.pt
2 - Departamento de Ciência e Tecnologia Alimentar, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra, 3040-316 Coimbra, Portugal

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the world fourth major food crop and one of the main staple foods, with tubers being usually stored to allow availability during the year. However, during storage tubers sprout, after a dormancy period what reduces the weight, the nutritional and processing quality of tubers and the number of marketable potatoes. Commercial methods used to control potato sprouting are storage at low temperatures, the use of chemical sprouting inhibitors, and irradiation. However, storage at low temperatures promotes the conversion of starch to sugars, increasing tubers sweetness and undesirable browning, due to Maillard reactions, while chemical sprouting inhibitors are facing increasingly restrictions in their use, and irradiation application to foods is very restricted in many countries. These limitations, together with the consumers willing to eat foods with low or no content of added chemicals, has put the focus on the study of new, chemical-free, consumer and environmentally friendly methods, to inhibit potato tubers sprouting.
High pressure processing (HPP) is an increasingly important physical food technology, being commercially applied to cold pasteurize food products, being also able to inactivate enzymes and induce gene expression modification, opening the possibility to affect physiological processes.

In this work, short duration (1 min) thermal treatments at 60, 65, 70, and 75ºC showed inhibitory effects on potato tubers sprouting. The inhibitory effect was increased when low intensity high pressure treatments (150 and 300 atmosphere for 10 min), that in a previous work showed also inhibitory effects on potato tubers sprouting, were applied prior to thermal treatments (60 and 65ºC). The inhibitory effect on sprouting was quantified by the evolution of sprouted tubers, number and mass of sprouts, and total length and length increment rate of sprouts. These results are promising to use sequentially combined high pressure and thermal treatments to control potato tubers sprouting.

Keywords. High pressure, thermal treatments, potato tubers sprouting inhibition.

9) Efeito de alta pressão a 20ºC na ligação de água e nas isotérmicas de sorção de amido de milho

Pedro Cunha & Jorge A. Saraiva

*Departamento de Química, Universidade de Aveiro (*jorgesaraiva@ua.pt)*

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the world fourth major food crop and one of the main staple A tecnologia de alta pressão é uma tecnologia cada vez com mais interesse para aplicações na área alimentar e em biotecnologia. A aplicação de alta pressão a biopolímeros como o amido, pode provocar alterações nas propriedades do amido, com possíveis utilizações em diversas áreas. Um dos fenómenos interessantes que pode promover novas propriedades do amido e levar a novas aplicações, é a ligação de água a "frio" ao amido, fenómeno que está ainda pouco estudado na literatura. O seu estudo é também importante para verificar eventuais alterações nas propriedades do amido em alimentos processados por pressão contendo amido *(1- 3).*

Neste trabalho estudou-se a ligação de água a 20ºC a amido de milho sujeito a tratamentos de alta pressão de 500 MPa (5000 atm), com diferentes tempos de pressurização. Foi possível ligar um máximo de cerca 3 g de água/g amido após 15 min de pressurização. Após a liofilização do amido processado, foi possível concluir ainda que a pressurização do amido causa alterações nas isotérmicas de sorção e desorção da água, por modelização das isotérmicas usando os modelos BET e GAB, tendo-se verificado uma diminuição da força de interacção da água ao amido, enquanto o conteúdo de água da monocamada não se altera significativamente.

Keywords. High pressure, thermal treatments, potato tubers sprouting inhibition.

Referências

1. Rahman, M. S.; 1998. *Handbook of Food Preservation*, 1ªEdição; USA; Marcel Dekker. pp. 533-569.
2. Blaszczak, W.; Valverde, S.; Fornal, J.; 2005. *Effect of high pressure on the structure of potato starch.* Carbohydrate Polymers, 59, 377-383.
3. Katapo, H.; Song, Y.; Jane, J., 2002. *Effect and mechanism of ultrahigh hydrostatic pressure on the structure and properties of starches.* Carbohydrate Polymer, 47, 233-244

10) The combined effect of high pressure and temperature on V_{max} and K_M of the enzyme horseradish peroxidase

Isabel R. Gomes, Andreia A. Pinto, Mickael da C. Santos, Ângelo C. Salvador, Marise F. de Oliveira, Cátia F. Martins, Clara F. Marques, Rosa Medde, Jorge A. Saraiva

*Departamento de Química, Universidade de Aveiro (*jorgesaraiva@ua.pt)*

Firstly used in the fields of chemistry and physics, the use of the so called high (hydrostatic) pressure (HP) is now an established method for cold pasteurization of foods. In what concerns enzymes, HP has the potential to change enzymes activity and selectivity.[1] The effect of HP on an enzymatic reaction is governed by the activation volume (Va) of the reaction: if Va is positive (negative), the reaction rate is decreased (increased) by pressure, while if it is zero there is no effect.

Due to its ubiquitous distribution in nature, high thermal resistance, and catalytic activity over several substrates, peroxidase (EC 1.11.1.7; donor:hydrogen-peroxidase oxidoreductase) is an enzyme used in industrial applications in several fields and with great potential for future applications.[2] Peroxidase also shows high resistance to HP (baric resistance).[3] Horseradish peroxidase is the most characterised and studied peroxidase and its main isoenzyme has been already cloned.[2]

In this work, the combined effect of HP (from atmospheric pressure to 500 MPa, ~5000 atm) and temperature (below and above room temperature) on the catalytic parameters (K_M and V_{max}) of horseradish peroxidase was studied. These type of works are on importance to help understand how living organisms thrive in deep sea waters, at high and low temperatures and under several hundreds atmospheres of pressure and the properties of its enzymes.

Although K_M changed over the combinations of HP and temperature studied, no particular trend was found. V_{max} showed more variation, with HP and temperature having antagonistic effects: i) above room temperature, the increase in activity caused by temperature was counteracted by HP; ii) below room temperature, the decrease in activity caused by temperature was counteracted by HP. V_{max} decreased for i) and increased for ii) several fold, compared to the value at atmospheric pressure (0.1 MPa). Generally, a different behaviour was found from atmospheric pressure up to 50-100 MPa and for higher pressures. The activation volume/activation (E_a) energy was calculated at the different temperatures/pressures studied, allowing to verify the effect of temperature on V_a and of HP on E_a and the pressure-temperature binomial for optimum activity.

Keywords: peroxidase activity, high pressure, temperature, activation volume, activation energy, Michaelis-Menten constant

References

1. Heremans K. and Smeller L., *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1998, **1386**, 353-370.
2. Veitch, N. C., *Phytochemistry*, 2004, **65**: 249–259.
3. Lemos, M. A., Oliveira, J. C., van Loey, A., Hendrickx, M. E., *Food Biotechnol.*, 1999, **13**:13-32

11) Biorrefinaria: valorização de subprodutos da indústria papeleira para produção de proteína microbiana (SCP)

Ana L. M. Ferreira, Pedro T. S. Silva, Susana R. Pereira, Luísa S. Serafim e Ana M.R.B. Xavier

CICECO - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

O cozimento da madeira ao sulfito ácido é um dos processos usados pela indústria papeleira na produção de pasta de papel. Um dos sub-produtos obtidos durante este processo é o licor de cozimento ao sulfito (SSL – *Spent Sulphite Liquor*). Em Portugal usa-se o *Eucalyptus globulus* como matéria-prima, obtendo-se um licor constituído principalmente por lenhossulfonatos, açúcares neutros, nomeadamente a xilose, e componentes voláteis, como ácido acético e furfural. A utilização deste licor para produzir produtos de elevado valor acrescentado, nomeadamente proteína microbiana, insere-se bem no conceito de biorrefinaria, para melhorar a sustentabilidade económica da indústria papeleira (1). O termo "Proteína microbiana" (*Single Cell Protein* - SCP) refere-se ao conjunto de células de bactérias, leveduras, fungos filamentosos ou algas, que para além de uma elevada quantidade de proteína, contêm hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos, sais minerais e vitaminas (2). *Paecilomyces variotii* é um fungo filamentoso que tem sido utilizado na produção de proteína microbiana devido à sua excelente capacidade de crescer numa grande variedade de resíduos industriais (3).

Neste trabalho promoveu-se o crescimento do fungo no licor num reactor descontínuo sequencial (*Sequential Batch Reactor* – SBR), com o objectivo de estudar e optimizar o processo. Foi também analisado o efeito da adição de alguns sais ao SSL. E verificou-se que se produziu maior quantidade de fungo nos ensaios que se utilizou licor suplementado com sais (0.13 g de biomassa/g de substrato consumido), o que poderá ser interessante, do ponto de vista de uma possível implementação industrial. Quando os sais foram adicionados, observou-se que o fungo consomiu mais rapidamente os açúcares do que o ácido acético. No entanto, no caso do ensaio apenas com licor o fungo filamentoso utilizado utilizou preferencialmente como fonte de carbono, o ácido acético presente no licor, em vez dos açúcares. Assim sendo, esta última estratégia foi a melhor para desacidificar o licor utilizando *P. variotti*, obtendo-se simultaneamente um produto de alto valor acrescentado (SCP) e um licor desacidificado que poderá ser utilizado para posterior bioprocessamento, originando outros produtos de elevado valor acrescentado.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Caima SA Portugal pela disponibilização do licor. Agradecem também à FCT pela bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/64522/2009) de Susana R. Pereira.

Referências

1. Marques, A.P., D.V. Evtuguin, S. Magina, F.M.L. Amado, and A. Prates. *Journal of Wood Chemistry & Technology*. **2009**, 29, 15.
2. Waites, M.J., *Industrial microbiology: an introduction*. 2008: Blackwell Science.
3. Almeida e Silva, J.B., U.A. Lima, M.E.S. Taqueda, and F.G. Guaragna. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **1998**, 15, 273.

12) Production of second generation bioethanol and single cell protein from high spent sulfite liquor

Diogo J. P. Nunes, Teresa M. R. Fonseca, Patrícia M. Domingues, Carlos M. Silva, Dmitry V. Evtuguin, Ana M. R. B. Xavier

Department of Chemistry, CICECO, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal

Hardwood Spent Sulphite Liquor (HSSL) is a side product from acidic sulphite wood pulping and is normally converted to energy by combustion. Besides sulphonated lignin, the HSSL contains sugars from degraded hemicelluloses, mainly pentoses like xylose (24,6 ± 0,05 g/L) [1].

The main objective of this work is to carry out yeast alcoholic fermentation of these sugars in order to produce 2nd generation bioethanol. The acetic acid present in HSSL (8,2 ± 0,3 g/L) is a known inhibitor of ethanol fermentation by yeasts [2]. Biological deacidification has been studied with *Paecilomyces variotti* that is also a *Single Cell Protein* producer [3]. Results showed that acetic acid was consumed and the maximum biomass yield obtained was 0,39g biomass/g of (glc + xyl + acetic acid). The maximum protein content in biomass was 63% and productivity was 7,78 mg prot L^{-1} h^{-1}. *Pichia stipitis*, a pentose consuming yeast, was used in order to produce ethanol from the deacidificated HSSL through its efficient metabolism in the alcoholic fermentation of xylose. The maximum ethanol yield was 0,13 g eth/g of (glc + xyl) and the maximum volumetric productivity was 74,9 mg $L^{-1}h^{-1}$.

The use of HSSL for these two integrated bioprocesses proved to be a promissory way of producing the two final products cited above, namely *Single Cell Protein* and bioethanol. The optimization of each process is being developed in order to improve and to allow industrial implementation on Pulp and Paper Industry.

Acknowledgments

D. J. P. Nunes thanks FCT for funding CICECO BII.

References

(1) Xavier, A. M. R. B.; Correia, M. F.; Pereira, S. R.; Evtuguin, D. V. *Bioresource Technology* **2010**, 101, 2755.
(2) van Zyl, C.; Prior, B. A.; du Preez, J. C. *Enzyme and Microbial Technology* **1991**, 13, 82.
(3) Waites, M. J.; Morgan, N. L.; Rockey, J. S.; Higton, G. *Blackwell Science*, USA, **2001**.

13) Effect of High Pressure on the enzymatic hydrolysis of carboxymethyl cellulose

Cátia Martins, Jorge A. Saraiva

Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

In the last years, research has focused on the possible feasible use of cellulose, the most abundant renewable bioresource, for the production of fermentable sugars that can be converted to fuels such as ethanol, due to the limited reserves of fossil fuels. [1] However, enzymatic hydrolysis of cellulose to fermentable sugars is difficult due to the tight packing of cellulose chains in microfibrils.

Firstly used in the fields of chemistry and physics, the use of the so called high (hydrostatic) pressure (HP), up to 1000 MPa (~10000 atm), is now viewed also with great potential to improve enzymatic reactions. [2,3] Under HP, due to water volume decrease and compaction, several physical events can occur, like increase of interactions between water and other molecules, due to the so called "electrostriction" occurrence. [4] This can be of interest to improve interaction of water with macromolecules, particularly those more tightly packed, by promotion of water (and solutes dissolved in it) "infusion" throughout the macromolecule.

With this background reasoning in mind, we decided to study the effect of HP treatments (from 50 to 500 MPa, during 1, 3, 5 and 15 minutes) on the subsequent enzymatic hydrolysis of carboxymethyl cellulose (CMC) at atmospheric pressure. The results showed an increased amount of reducing sugars resulting from CMC enzymatic hydrolysis, when the reactional system (CMC/buffer/cellulase) was submitted to HP at the beginning of the reaction. As an example, when 100 MPa was applied for 1 minute, production of reduction sugars increased by 160-fold after 5 min of reaction time. The amount of reducing sugars resulting from CMC hydrolysis correlated linearly with the pressure level, for the same time under HP. The results of this first study are promising to further develop new processes leading to more efficient cellulose enzymatic hydrolysis. Experiments are under way to obtain evidences for the hypothesized water infusion through cellulose.

Acknowledgments

Author Cátia Martins acknowledges Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for the scholarship Bolsa de Integração na Investigação (BII*)*

References

[1] M. B. Turner, S. K. Spear, J. G. Huddleston, J. D. Holbrey and R. D. Rogers, *Green Chem.*, **2003**, 5, 443-447.

[2] K. Heremans and L. Smeller, Biochim. *Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1998**, 1386, 353-370.

[3] S. M. Castro, A. Van Loey, J. A. Saraiva, C. Smout and M. Hendrickx, *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, 38, 831-838.

[4] P. C. Michels, J. S. Dordick and D. S. Clark, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9331-9335

14) Biodegradability studies of materials from renewable sources

Eliane Trovatti, Jaqueline Rocha, Carmen Freire, Armando Silvestre and Carlos P. Neto

Department of Chemistry/CICECO, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Throughout history, we observed a progressively increase of the social concern about environmental protection, mainly because society is increasingly aware of the environmental damages caused by industrial development and of their potential disastrous consequences to the future of the planet and humankind.

One majour environmental problem is related with the extensive use of plastics. Plastics have been widely used because of their lightweight, inertness and low cost. The increasing consumption of plastics, especially in packaging applications, results in a huge accumulation of wastes, which precisely due to their non-biodegradable character are responsible for serious environmental problems: a conventional polymer once left in the soil takes more than hundred years to degrade. Therefore, an ideal plastic should present desirable industrial properties and be degradable within a satisfactory period of time.[1]

Biodegradation consists of chemical degradation, caused by biological activity, producing water, biomass and organic compounds, as well as carbon dioxide if degradation is aerobic or methane if it is anaerobic. The biodegradability of a material is influenced by the chemical composition and structure, environmental conditions (pH, humidity, temperature, etc.) and the exposure time. Biodegradation is also influenced by microbiological factors, such distribution, abundance, diversity and activity of the microorganisms.[2]

In this work, we studied the biodegradation of several polymeric materials: namely, poly(ethylene therephtalate) (negative control), cellulose (positive control), polycaprolactone (PCL), chitosan, chitosan+30% of cellulose fiber and poly(1,12-dodecilene decanoate). The biodegradability was studied using three tests: a screening test based on enzymatic activity and two tests which simulate *in situ* conditions, one to observe the samples degradation and the other to observe the carbon dioxide evolution, during two months of soil incubation.[3,4]

Acknowledgments
Thanks are due to the Department of Chemistry and to CICECO.

References

(1) Coelho, N. S.; Almeida, Y. d. M. B.; Vinhas, G. r. M. *Polímeros* **2008**, *18*, 270-276.
(2) Goncalves, S. P. C.; Martins-Franchetti, S. M. *J. Polym. Environ.* **2010**, *18*, 714-719.
(3) Itävaara, M.; Vikman, M. *J. Polym. Environ.* **1996**, *4*, 29-36.
(4) Yabannavar, A. V.; Bartha, R. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 3608-3614.

15) Estratégias de preparação e modificação de nanopartículas de Au para utilização em bio-sensores

Sónia O. Pereira, Ângela S. Pereira, Ana V. Girão, Tito Trindade, Ana Barros-Timmons

Department of Chemistry-CICECO, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

As propriedades ópticas das nanopartículas de ouro (NPs de Au) dependem do tamanho e forma, estado de agregação e do meio (bio)químico em que se encontram (1). Neste trabalho estudaram-se dois métodos distintos de preparação deste tipo de NPs: (i) recorrendo à modificação da superfície de NPs, previamente preparadas pelo método de Turkevich (citrato), com o polielectrólito hidrocloreto de polialilamina (PAH) e (ii) através da síntese *in situ* na presença de PAH, tirando partido do carácter redutor dos grupos amínicos deste polímero. A preparação das NPs foi seguida por espectroscopia de absorção no visível e por dispersão dinâmica de luz. Além disso, no sentido de melhor compreender o efeito de cada um dos métodos nas características finais das NPs, estas foram caracterizadas por medidas de potencial zeta e microscopia electrónica de transmissão (Figura 1).

Através do método (i) obtiveram-se NPs de Au com 14.3 nm ± 2.6 nm de diâmetro e uma banda de ressonância de plasmão de superfície (SPR) a 527 nm. Por seu turno, através do método (ii) obtiveram-se NPs de Au com 13.4 ± 2.4 nm de diâmetro e uma banda de SPR a 559 nm.

Uma vantagem adicional destas estratégias de preparação e modificação de NPs de Au, é a possibilidade de para além da permitirem a preparação de soluções coloidais estáveis, permitirem ainda a funcionalização da camada de PAH com fluoróforos e/ou como materiais biológicos, sendo assim possível preparar nanomateriais com interesse para bio-sensores (2-3). Neste contexto, serão ainda discutidos resultados preliminares relativos à funcionalização do PAH com um derivado da fluoresceína, o isotiocianato de fluoresceína - FITC, e também com biotina, bem como sobre as respectivas propriedades ópticas dos nanomateriais preparados e potencial utilização em bio-sensores.

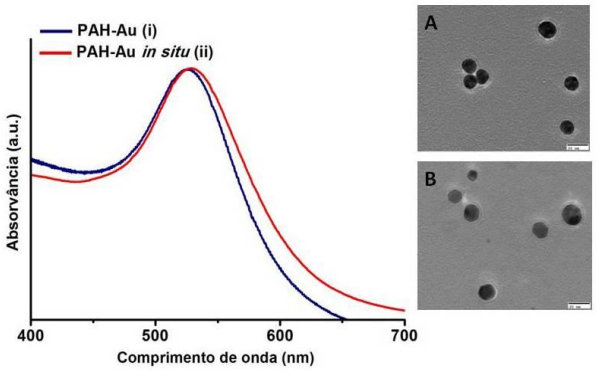


Figura 1: Espectros no visível do PAH-Au e do PAH-Au *in situ*; Imagens TEM das amostras A) PAH-Au e B) PAH-Au *in situ.*

Agradecimentos
Ana V. Girão e Ângela S. Pereira agradecem à FCT pelo suporte financeiro das suas bolsas de pós-doutoramento SFRH/BPD/66407/2009 e SFRH/BPD/44398/2008, respectivamente.

Referências
(1) Liz-Marzán, L. M., *Materials Today* **2004**, 7 (2), 26-31.
(2) Schneider, G.; Decher G., *Nano Letters* **2004,** *4* (10), 1833-1839.
(3) Labouta, H. I.; Schneider, M., *International Journal of Pharmaceutics* **2010,** *395* (1-2), 236-242.

16) Aplicação de uma porfirina catiónica na inactivação fotodinâmica de um biofilme bacteriano

Ana E. M. Alves[1], Adelaide Almeida[2], Newton C.M Gomes[2], Maria A. F. Faustino[1], Maria G. P. M. S. Neves[1], Ângela Cunha[2]

[1]*Departamento de Química & QOPNA, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal*
[2]*Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal*

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) combina a acção da luz com fotossensibilizadores (PS) para a inactivação de microrganismos.[1] O PS quando activado por luz na presença de oxigénio molecular, gera espécies reactivas de oxigénio (ROS), em particular, oxigénio singuleto ($^1O_2$),[2] responsável por danos celulares que levam à morte dos microrganismos.[3]

A organização em biofilmes, confere às células resistência acrescida a agentes antimicrobianos, relativamente às formas livres. Este fenómeno e a decorrente necessidade de utilização de concentrações elevadas de agentes químicos, revela-se um problema, quer na área clínica, quer na área ambiental. Os macrociclos porfirínicos, nomeadamente, derivados catiónicos têm sido testados com sucesso na fotoinactivação de microrganismos, designadamente vírus, bactérias (células vegetativas e endósporos) e fungos.[4] No entanto, a sua aplicabilidade na inactivação de biofilmes está menos estudada. O objectivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis (1-metilpiridinium-4-il)porfirina (Tetra-Py^+-Me) como PS, na inactivação de biofilmes bacterianos, usando como modelo uma estirpe ambiental de *Pseudomonas* sp.

Para a obtenção do biofilme, transferiu-se um volume adequado de cultura em meio líquido para microplacas de 12 poços que foram incubadas a 28ºC durante 48 horas. A fotoinactivação do biofilme foi testada após remoção da cultura líquida, exposição das células aderentes a diferentes concentrações (5, 10 e 15 µM) de Tetra-Py^+-Me, e irradiação com luz branca (400-800 nm, 50mW cm^{-2}). Após exposição à luz em intervalos pré-definidos (5, 10 e 15 min) procedeu-se à colheita e ressuspensão de amostras de biofilme para determinação do teor de células viáveis por contagem de colónias.

Os resultados mostram que ao fim de 15 minutos de irradiação e para as concentrações mais elevadas (10 e 15 µM) se obteve uma redução de 4 log na concentração de células do biofilme. Estes resultados confirmam que o derivado Tetra-Py^+-Me tem potencial como PS também na fotoinactivação de biofilmes bacterianos numa gama de concentrações relativamente baixa.

Agradecimentos
Agradece-se à Ana Luísa Santos a cedência da estirpe de *Pseudomonas* sp. usada neste trabalho.

Referências

1) Wainwright, M. 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemotherapy*. 42:13-28.
2) Ackroyd, R.., Kelty, C., Brown N., and Reed, M. 2001. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 74(5): 656-669.
3) Luksiene, Z. 2005. New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization. *Food Technol. Biotechnol.* 43(4): 411-418.
4) Carvalho, C.M.B., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A.F., Neves, M., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Costa, L., Alves, E., Oliveira, A. and Cunha, Â. (2009) Antimicrobial photodynamic activity of porphyrin derivatives: Potential application on medical and water disinfection. *J Porphyrins Phthalocyanines* 13, 574-577.

17) Environmentally friendly molecular structures

Daniel F. Martins, Ana C. Gomes, Anabela A. Valente, Martyn Pillinger, Isabel S. Gonçalves

CICECO, Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus de Santiago, P-3810-193 Aveiro, Portugal

Organic compounds containing sulfur are a small but extremely important fraction of fossil fuels, and due to their difficult biodegradability they are considered recalcitrant compounds. The presence of this element is undesirable not only because it contributes to the corrosion of the equipment in refineries, but when the combustion of these products occurs they release SO2, one of the principle atmospheric polluters and responsible for acid rain. The malefic effects caused by SO2 in the atmosphere prompted the European Union to restrict the SO2 emissions. This project aims to give continuity to a previous study centered on the preparation of some polymeric oxomolybdates and their catalytic application for the sulfoxidation of thiophene, benzothiophene and other organic compounds containing sulfur.

Acknowledgments

We are grateful to FCT for funding through the Project PTDC/QUI/71198/2006. DFM thanks the FCT for BII grant. We also wish to thank the Associated Laboratory CICECO for a research grant to ACG.

References

•Kuhn, F.E., et al., *Octahedral bipyridine and bipyrimidine dioxomolybdenum(VI) complexes: Characterization, application in catalytic epoxidation, and density functional mechanistic study.* Chemistry-a European Journal, 2002. **8**(10): p. 2370-2383

•Gunyar, A., et al., *Studies on bis(halogeno) dioxomolybdenum(VI)-bipyridine complexes: Synthesis and catalytic activity.* Dalton Transactions, 2009(40): p. 8746-8754.

•Günyar, A. and F.E. Kühn, *Bidentate Lewis base adducts of molybdenum(VI): Ligand impact on catalytic performance and stability.* Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2010. **319**(1-2): p. 108-113.

18) Walnut shell valorization in the removal of bisphenol-A from water

Sofia Amaro, Isabel Macedo

Chemistry Departament, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Bisphenol-A (BPA) is one of the highest volume chemicals produced worldwide. It is widely used in the plastic industry, being part of baby bottles, food packaging material, etc. However it is classified as an emerging pollutant, which means that the concentrations of BPA found in the environment – coming mainly from urban and industrial effluents - are a current concern[1].

Liquid phase adsorption has proved to be a very effective method for the reduction of pollutants in industrial and domestic wastewater. Due to its porous structure, activated carbon is often chosen as the adsorbent in the process.

Walnut shell, an abundant agricultural waste product, is known to be a good precursor of activated carbon[2]. It is thus a promising biotechnological tool in environmental remediation processes. On the other hand, the adsorption of BPA onto activated carbon is not well documented. In this work we studied the adsorption of BPA onto walnut-shell-based activated carbon. Kinetic and equilibrium studies were investigated at different initial BPA concentrations.

The walnut shell was ground and separated into different particle-size fractions. The 240-500 μm fraction was chemically activated with $ZnCl_2$ (1:2 m:m) at 105ºC and 500ºC under N_2 flow. Once obtained, the activated carbon was used in adsorption experiments with aqueous solutions of BPA of initial concentrations ranging from 5 to 60 ppm. BPA in solution was quantified by UV spectrophotometry.

The experimental data fit well into a Freundlich isotherm (r^2= 0,9487). Two adsorption kinetic models, pseudo-first order and pseudo-second order, were used to fit the experimental data. The pseudo-second order model gives the best description of the adsorption process: r^2 = 0,9935, 0,9953 and 0,9939 for initial BPA concentrations 5, 30 and 60 ppm, respectively.

References

(1) Arnold Schecter; Noor Malik; *Environmental Science & Technology*. **2010**, 44, 9425.
(2) Juan Yang; Keqiang Qiu; *Chemical Engineering Journal*. **2010**, 165, 210.

19) Aplicação de um método rápido de detecção bacteriana para avaliar a eficácia da terapia fágica como alternativa para inactivar bactérias patogénicas em pisciculturas.

Yolanda Silva[a], Ricardo Calado, Newton Gomes, Ângela Cunha, Adelaide Almeida

[a]*CESAM, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro,* yolanda@ua.pt

A importância crescente da aquacultura mundial, para compensar a progressiva pressão sobre as populações naturais de peixes, e o facto de várias pisciculturas sofrerem, frequentemente, grandes perdas económicas, devido a infecções causadas por microrganismos patogénicos, incluindo bactérias multirresistentes, impõe a procura de métodos alternativos, tais como a terapia fágica, para a inactivação de bactérias patogénicas.

A terapia fágica consiste na utilização de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) para inactivar bactérias patogénicas e apresenta várias vantagens quando comparada com os métodos convencionais. O seu uso requer, no entanto, a compreensão de novos fenómenos cinéticos desconhecidos nos tratamentos convencionais. A teoria cinética indica que a concentração de bactérias e fagos aplicados, bem como a estabilidade destes em relação aos factores ambientais, podem ser fundamentais. Para adquirir conhecimento sobre estes aspectos são necessários métodos de análise microbiológica mais rápidos do que os métodos convencionais de sementeira.

O objectivo deste trabalho foi aplicar um método rápido de detecção bacteriana para desenvolver um protocolo de terapia fágica dirigido à inactivação de bactérias patogénicas de peixes. Para tal foi utilizada uma estirpe bioluminescente de *Escherichia coli*, geneticamente modificada, e um sistema de detecção de emissão de luz. Os resultados mostraram que a terapia fágica é eficaz para controlar infecções bacterianas em águas piscícolas (diminuição de 3 log no teor de bactérias após 24h) e que a diminuição de bioluminescência acompanhou a diminuição da concentração de unidades formadoras de colónias. Com este método foi possível seleccionar a melhor concentração de fagos a adicionar às culturas bacterianas para obter uma inactivação eficaz e foi também possível monitorizar o processo da infecção fágica em tempo real, de uma forma mais rápida, barata e muito menos trabalhosa do que os métodos convencionais.

Agradecimentos:
FCT: Bolsa de doutoramento **SFRH/BD/65147/2009** e Projecto de investigação **PTDC/AAC-AMB/112934/2009**

20) (Eco)toxicity of ionic liquids towards to freshwater green algae (Pseudokirchneriella subcapitata and Chlorella vulgaris)

Fábio M. M. Ferreira[1], Sónia P. M. Ventura[1], Joana L. Pereira[2], Fernando Gonçalves[2], João A. P. Coutinho[1]

[1]*CICECO Chemistry Department, University of Aveiro, Aveiro, Portugal*
[3]*CESAM, Biology Department, University of Aveiro, Aveiro, Portugal*

Ionic Liquids (ILs) are a new class of solvents, which are liquids at room temperature. These class of compounds have been widely studied due to their unique, interesting and "green" properties. Their negligible vapor pressure and inflammability [1] makes them as environmentally friendly solvents. The potential "green" performance of ILs gave them special attention in several branches of chemical industry as substitutes of conventional organic solvents. However and based on the solubility and stability of ILs in water, the release of these compounds into aquatic systems may lead to water pollution, with subsequent risk to aquatic organisms. Some progresses have been done concerning ILs' toxicity, however the information is still scarce [2]. The main aim of this work is to determine the toxicity effects of water different pyridinium and imidazolium- based ILs towards freshwater green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata and Chlorella vulgaris*. Both algae showed to be negatively affected by all the ILs in study. These results highlight the importance of (eco)toxicological studies in order to evaluate ILs' effects in aquatic organisms. Therefore, an overdosage or a bad usage of these compounds may have severe repercussions in aquatic organisms and consequently in the trophic food web [3].

References

1. Pham, T.P.T., et al., *Alkyl-chain length effects of imidazolium and pyridinium ionic liquids on photosynthetic response of Pseudokirchneriella subcapitata.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008. **105**(4): p. 425-428.
2. Kulacki, K.J. and G.A. Lamberti, *Toxicity of imidazolium ionic liquids to freshwater algae.* Green Chemistry, 2008. **10**(1): p. 104.
3. Thuy Pham, T.P., C.-W. Cho, and Y.-S. Yun, *Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review.* Water Research, 2010. **44**(2): p. 352-372.

21) Partition of bovine serum albumin in ionic liquid based aqueous two-phase systems

M. S. G. Sousa[1], S. P. M. Ventura[1], M. G. Freire[2], A. S. Lima[3] and J. A. P. Coutinho

[1]*Department of Chemistry & CICECO, University of Aveiro, Aveiro, Portugal*
[2]*ITQB, Institute of Chemical and Biological Technology, Oeiras, Portugal*
[3]*Tiradentes University, Aracaju, Brazil*

Aqueous two-phase systems (ATPS) appear as promising separation techniques in the extraction and purification of biomolecules, since they can be considered harmless to them and they provide high water content and a neutral pH value [1]. A recent alternative for ATPS is the use of ionic liquids (ILs) which appear as potential substitutes for the volatile organic compounds currently employed. Moreover, the possibility of fine-tuning their thermophysical properties and solvation/extraction performance by judicious selection of both cation and anion is an important feature [2].

In this work, a wide range of imidazolium and phosphonium-based ILs (Fig. 1) was studied in what concerns their ability on the formation of ATPS and their capacity to the extraction of macromolecules. Ternary phase diagrams formed by these ILs, water and inorganic salts (K_3PO_4, K_2HPO_4 and both K_2HPO_4 + KH_2PO_4 called phosphate buffer PB) were measured, at 298 K and atmospheric pressure. The influence of different inorganic salts, IL alkyl chain lengths, anions and cations, as well as the effect of pH in the formation of ATPS was evaluated. The results indicate that the ability of an IL to induce ATPS is dependent of their hydrophobicity. In addition, the partition capacity of some studied ATPS was evaluated through their application to the extraction of the standard protein bovine serum albumin (BSA). It is shown that the partition coefficients obtained for BSA are dependent of the hydrophobicity of the IL, since the BSA protein has a higher affinity for hydrophilic systems, being the most efficient IL for BSA separation the [C_2mim][CH_3COO].

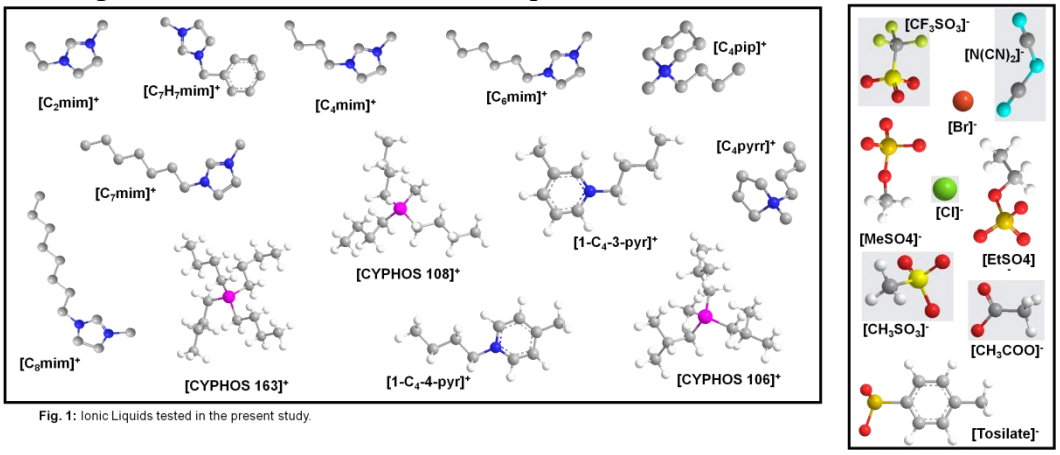


Fig. 1: Ionic Liquids tested in the present study.

Acknowledgments
Thanks are due to the *CICECO* Research Unit.

References
[1] R. Hatti-Kaul, Human Press, New Jersey (2000), Volume 1.
[2] N. J. Bridges, K. E. Gutowski and R. D. Rogers, Green Chem. (2007), Volume 9, 177.

22) Study of the major effects of ionic liquids towards the enzymatic activity and stability of Candida antarctica lipase B

Francisca A. e Silva, Sónia P. M. Ventura, João A. P. Coutinho

CICECO & Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

Aiming the reduction of the high costs of the purification steps in the enzyme production, many processes and techniques have been studied as synonym of purification, standing out this scope those using biphasic systems especially containing ionic liquids (ILs).[1] A systematic study of the effects of various ILs on the enzymatic activity and stability of *Candida antarctica* lipase B is here carried. Parameters such as the IL concentration, the effect of different anions, cations and the cation alkyl chain lengths were considered and studied. The structure of these ILs was based on imidazolium, pyrrolidinium, pyridinium and piperidinium cation. The imidazolium cation was used in the study of the effect of the alkyl chain lenght, which was varied from 2 to 8 carbons. The studied anions were bis(trifluoromethylsulfonyl)imide [NTf_2^-], hexafluorophosphate [PF_6^-], trifluoromethanesulfonate [$CF_3SO_3^-$], methanesulfonate [$CH_3SO_3^-$], chloride Cl^-, bromide Br^-, trifluoroacetate [TFA^-], hydrogenosulfate [HSO_4^-], acetate [CH_3COO^-] and dicyanamide [$N(CN)_2^-$]. The enzyme activity and stability were assayed spectrophotometrically. The results suggest that the enzymatic activity and stability are affected by all the parameters in study. Besides, the hydrophobic anions induce lower losses on the enzyme activity and stability than the hydrophilic. The imidazolium cation has the smallest impact on the enzymatic activity, while the piperidinium cation induced the largest losses. It was also noticed that increasing the cation alkyl chain, the enzymatic activity decreases. In order to explain some possible conformational modifications, SH groups were quantified, being its increase a sign of lower half-life times and, consequently, inferior enzymatic stability.

Acknowledgments
This work was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia.
A sincere acknowledge to Sr. Armindo Ribeiro Gaspar, who kindly provided the enzyme CaLB.

References
(1) Martínez-Aragón, M.; Burghoff, F.; Goetheer, E. L. V.; Haan, A. B. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 65, 65-72.

23) Effect of high hydrostatic pressure on flavonoids extraction from (*Humulus lupulus* L.) hops

Fátima L. Sousa, Mickael C. Santos and Jorge A. Saraiva

Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Hops, the female flower clusters of Humulus lupulus is an essential ingredient in beer production, imparting beer with several organoleptic and sensorial properties. Moreover, some hops constituents are now known to have important health promoting properties and is the case of flavonoids, a group of phenolic compounds. Particularly important is the case of xanthohumol, the main flavonoid of hops that has been shown to inhibit the development of tumors in early stages, to reduce the proliferation of pre-adipocytic cells, to have sedative and anti-inflammatory activities among several others. [2,3] At least some of these flavonoids are passed to wort beer during wort boiling and in smaller amounts appear on beer, contributing to increase the health benefits of beer consumption. [1]. Currently, for the sake of easier preservation and easiness of use, the beer industry uses hops extracts instead of hops itself. These extracts are usually produced by ethanol extraction, in a process that takes time and involves the use of temperature, what causes degradation of some of the flavonoid compouds showing health promoting characteristics.

This work aimed at evaluate the effect of High (Hydrostatic) Pressure (HP) at room temperature on extraction of flavonoids from hops, by quantifying total flavonoids. Various experimental conditions were tested, such as concentration of ethanol (10-90%, v/v), time of extraction under pressure of (1 and 5 min) as well as the ratio of hops to extraction solvent (from 5:1 to 200:1) and pressure level (200 or 400 MPa). Generally, extraction under pressure resulted in higher amounts of flavonoids. For instance, use of 30 and 50% of ethanol under pressure yielded similar results, compared to 90% ethanol at atmospheric pressure. Additionally, in the former case, much less extraction of chlorophylls was verified, resulting in an extract with a yellow color, while in the latter case a green color was observed. This is an important advantage since chlorophylls presence in hops extracts for beer production is undesirable.

References

[1]Stevens, J.F. and J.E. Page, Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! Phytochemistry, 2004. 65(10): p. 1317-1330.

[2]Monteiro, R., et al., Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts. Journal of Cellular Biochemistry, 2008. 104(5): p. 1699-1707.

[3]Miranda, C.L., et al., Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (Humulus lupulus) in human cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology, 1999. 37(4): p. 271-285.

24) Valorisation of industrial by-products into volatile fatty acis (VFA) by anaerobic digestion

F. Sousa, S.R.S. Pereira, A. M.R.B. Xavier, D. V. Evtuguin, Luísa Seuanes Serafim
Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

Nowadays the economy is mainly dependent on fossil fuels. Pollution, climate changes and eminent exhaustion of natural resources (fossil fuels) are the main consequences of this dependence [1]. Anaerobic Digestion (AD) has shown great potential in using renewable resources such as management residues from agriculture, industry and also from forestry. AD is a biological process by which organic matter is transformed into methane and carbon dioxide in the absence of oxygen. The digestion process begins with bacterial hydrolysis of the input materials in order to break down insoluble organic polymers, such as carbohydrates, and make them available for other bacteria. Acidogenic bacteria then convert sugars and amino acids into carbon dioxide, hydrogen, ethanol and volatile fatty acids (VFAs) [2, 3]. VFAs are then converted into acetic acid, along with additional hydrogen, and carbon dioxide. Finally, methanogens convert these products to methane and carbon dioxide.

HSSL (Hardwood Spent Sulfite Liquor) is a by-product of the paper industry, rich in lignocelluloses that with appropriate pre-treatment provide carbon substrates as acetic acid, xylose, glucose and other sugars. HSSL can serve as substrate for yeast like *Pichia* stipitis to produce ethanol. After the fermentation process the fermentative medium still contains a high amount of sugars that can act as substrate in an AD step to produce added value products like hydrogen, ethanol or VFAs [4]. Therefore, the main objective in this work is not only to valorise HSSL but also apply AD (with methanogenesis suppressed) to the fermentative medium after *P. stipitis* ethanol production, including the yeast biomass. Operational parameters as carbon and nitrogen concentration, initial pH and biomass concentration and retention time will be evaluated in order to optimise the amount of VFAs produced.

References:

[1]Zhang, Y.-H, 2008. *Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocelluloses biorrefineries*. J Ind Microbiol Biotechnol. 35, 367-375
[2]Alves M., Mota M., 'Reactores para tratamento Anaeróbio', *Reactores Biológicos-Fundamentos e Aplicações, Lidel*,.Lisboa
[3]Marta-Alvarez,J.,Macé,S.,Llabrés, P.,2000. *Anaerobic digestion of organic solid wastes:na overview of reach achivements and perpectives*. Bioresour. Technol. 74, 3-16.
[4]Nigam, J. N. (2001). *Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of Pichia stipitis.* Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **26**(3): 145-150.

25) Comparação da fermentação de HSSL com *Pichia stipitis* em cultura suspensão vs. cultura imobilizada para a produção de bioetanol de segunda geração

Jean D. Santos, Diogo J. P. Nunes, Susana R. Pereira, Daniel L. A. Fernandes, Ana M. R. B. Xavier, Luísa S. Serafim

Departamento de Química & CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal

O HSSL (Licor de Cozimento ao Sulfito Ácido) é um subproduto da indústria papeleira que resulta do processo de cozimento ao sulfito ácido. Além de lenhosulfonatos, o HSSL é rico em monossarídeos, principalmente xilose (24,6 g/L)[1]. Verifica-se ainda a presença de ácido acético (8,2 g/L), que nesta concentração é um inibidor da fermentação alcoólica realizada pela *P.stipitis*[2]. O HSSL para além de um pré-tratamento físico-químico para remover impurezas é sujeito a um tratamento biológico com o fungo *Paecilomyces variotti* para consumir o ácido acético reduzindo-o a concentrações não inibitórias para a fermentação alcoólica de *P. stipitis*.

O objectivo deste trabalho foi a comparação da fermentação do licor de cozimento ao sulfito ácido por parte de culturas em suspensão e imobilizadas de *Pichia stipitis*.

Inicialmente foi testado o método de imobilização em YM e verificou-se que a produção de etanol em meio sintético era cerca de três vezes superior nas fermentações com *P.stipitis* imobilizada do que com a levedura livre. De seguida compararam-se as fermentações com HSSL com *P. stipitis* livre e imobilizada. Com a cultura imobilizada atingiu-se um rendimento em etanol de 46,6% (g etanol / g (glc + xil + ac.acét.)) o que comprova a eficácia fermentativa deste novo método testado. O rendimento com *P.stipitis* livre foi aproximadamente cinco vezes menor, 12,8% (g etanol / g (glc + xil + ac.acét.)). Este trabalho mostra que um resíduo da indústria papeleira, o HSSL pode servir como substrato para a produção de bioetanol de segunda geração por *P.stipitis* imobilizada num processo de biorrefinaria.

Referências:

(1) Xavier, A. M. R. B.; Correia, M. F.; Pereira, S. R.; Evtuguin, D. V. Bioresource Technology 2010, 101, 2755.
(2) van Zyl, C.; Prior, B. A.; du Preez, J. C. Enzyme and Microbial Technology 1991, 13, 82.

26) Selection of PHA-producing organisms using a by-product of pulp industry

H. Passos[1], N. Lazarova[1], P.C. Lemos[2], D. Evtuguin[1], A.M.R.B. Xavier[1], L.S. Serafim[1]

[1] Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal
[2] REQUI*M*TE/CQFB, Chemistry Department, FCT/UNL, 2829-516 Caparica, Portugal
e-mail: luisa.serafim@ua.pt

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable plastics that can be synthesized by bacteria from renewable resources. The greatest drawback for their use as substitutes of petrol-based polymers is the production cost. New processes with lower production costs are required like those using mixed microbial cultures (MMC) that do not need sterilization and facilitate the use of complex substrates. [1] Hardwood spent sulphite liquor (HSSL) is a by-product of the pulp industry, rich in xylose and acetic acid, which can be used as a substrate for the production of various compounds with economic value, such as ethanol and PHAs. Aerobic dynamic feeding (ADF) is a process of selection of MMC with high capacity for accumulation of PHAs. Microorganisms are subjected to alternating periods of excess and shortage of carbon source and only those who are able to accumulate internal reserves (PHAs) in periods of "feast" can survive to periods of "famine". [2] The objective of this work was the evaluation of HSSL to act as a substrate for PHA production by MMC. Three MMC populations (Culture A, B and C) with different origins were tested in order to determine the best conditions to select a population showing a stable PHA production.

Three different MMC (A, B and C) were inoculated in a Sequenced Batch Reactor (SBR) and their ability in adapting to a medium containing HSSL and producing PHAs was evaluated. Culture A was collected from an aerobic tank a station wastewater treatment. Culture B was collected in a SBR which was in operation for about one month under ADF conditions with a mixture of acetate and propionate as carbon source. Culture C was collected from a SBR operated for more than two years under ADF conditions with fermented sugar cane molasses as carbon source with a very good performance in PHAs production [3]. The SBR with culture A was operated for 70 days and the culture showed the ability in using the HSSL for growth and PHA storage. Under aerobic conditions MMC usually consume only acetic acid. However, sugars (glucose and xylose) were also used for growth and accumulation of PHA. From day 20, a slightly increase in the amount of acetic acid was observed probably due to the fermentation of sugars. The maximum PHA storage was 20.6% in the 28th day of operation.

Culture B was collected in a SBR which was in operation for about one month under ADF conditions with a mixture of acetate and propionate as carbon source. The SBR was operated for 34 days and, as culture A, showed the ability to use HSSL for growth and PHA storage, not only using acetic acid but also sugars. The percentage of maximum PHA storage was 13.6% recorded in the 23th day of operation. Using FISH, the microbial community of culture B was analyzed morphologically and taxonomically. The MMC of culture B was composed by small and large bacilli belonging to the Gamaproteobacteria class. More elongated bacilli were also observed probably belonging to the class of Betaproteobacteria, although the specific probe did not give positive signal probably due to experimental problems. Large cocci tightly packed in tetrads which usually belong to the class of Alphaproteobateria but the specific probe did not give positive signal were detected in a lower amount. *Thauera* and *Azoarcus* genera that are usually found in these systems operated under ADF conditions were not observed in this system. This probably indicates that they are not

adapted to HSSL. Although it was enriched in genera *Thauera* and *Azoarcus* [3], which are renowned for their ability to accumulate PHA in ADF conditions, culture C did not have the necessary diversity to adapt to the HSSL and the system came into wash-out.

Results showed that PHA-producing organisms can be selected using HSSL as substrate. Not only acetic acid but also xylose were consumed for PHA production. Probably xylose was used but directly and after fermentation to acetic acid. Future studies will evaluate the role of xylose and the type and proportion of monomers as also the physical and chemical characteristics of the polymer produced.

1) L.S. Serafim, P.C. Lemos, M.G.E. Albuquerque and M.A.M. Reis, "Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable wastematerials", Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 81, pp. 615-628, 2008.
2) L.S. Serafim, P.C. Lemos, R. Oliveira and M.A.M. Reis, "Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions", Biotechnol. Bioeng., vol. 87(2), pp. 145-160, 2004.
3) M.G.E. Albuquerque, C.A.V. Torres and M.A.M. Reis, "Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection", Water Res., vol. 44, pp. 3419-3433, 2010.
4) A.M.R.B. Xavier, M.F. Correia, S.R. Pereira and D.V. Evtyugin, "Second generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor", Biores. Technol. Vol. 101, pp. 2755-2761, 2010.
5) M. Yilmaz, H. Soran, and Y. Beyatli, "Determination of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus spp*." . World J. of Microbiol. Biotechnol., vol. 25(4), pp. 565-566, 2005.
6) P.C. Lemos, C. Levantesi, L.S. Serafim, S. Rossetti, M.A.M. Reis and V. Tandoi, "Microbial characterisation of polyhydroxyalkanoates storing populations selected under different operating conditions using a cell-sorting RT-PCR approach", Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 78, pp. 351–360, 2008.

27) Efeito do processamento por alta pressão nas propriedades funcionais de isolados de proteína de soja comerciais e suas misturas com goma de alfarroba

Sónia R.Monteiro, J. Saraiva, J. A. Lopes da Silva

QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

As proteínas de soja possuem elevado valor nutricional e funcional, sendo uma excelente alternativa às proteínas animais. Entre as estratégias possíveis para melhoria das propriedades funcionais destas proteínas, encontra-se já descrita a utilização de alta pressão (1) ou a modificação dessas propriedades por adequado controlo da interacção com polissacarídeos (2). A combinação de diferentes estratégias encontra-se muito menos explorada e pode revelar-se como uma via vantajosa para a melhoria das propriedades funcionais destes sistemas. Assim, com este trabalho, pretendeu-se avaliar o efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas propriedades emulsionantes e gelificantes de um isolado de proteína de soja comercial (IPS) e sua mistura com goma de alfarroba (GA), um heteropolissacarídeo neutro não gelificante. Soluções aquosas de IPS e GA, a pH neutro, foram submetidas a pressão entre 50 e 450 MPa durante 15 minutos. As características físico-químicas avaliadas incluíram o grau de solubilidade, turbidez e conteúdo de grupos –SH livres. A capacidade gelificante dos IPS e das misturas IPS-GA foi avaliada através de ensaios reológicos dinâmicos não destrutivos, por varrimentos em temperatura e frequência a baixa amplitude de deformação. A microestrutura dos IPS e das misturas liofilizadas foi analisada por microscopia electrónica de varrimento. Os resultados obtidos demonstram que processamentos até 100 MPa resultaram no aumento progressivo da solubilidade, acompanhado por um aumento do conteúdo de grupos SH livres. A partir de 100 MPa observa-se a inversão dos efeitos descritos. A presença da GA desempenhou um papel baroprotector. As condições de pressão aplicadas exerceram influência sobre a capacidade gelificante dos IPS e respectivas misturas. Os resultados sugerem que as alterações promovidas pelo processamento por alta pressão nas proteínas de soja (desnaturação e agregação) constituem um factor limitante para o desdobramento e re-associação durante o aquecimento térmico, necessários para a formação e fortalecimento do gel formado, e para as interacções estabelecidas com o polissacarídeo.

Agradecimentos

Sónia R.Monteiro agradece o apoio recebido através da bolsa SFRH/BD/24335/2005, financiada pela FCT (Lisboa, Portugal)

Referências

(1) X.S. Wang, C.H. Tang, B.S. Li, X.Q. Yang, L. Li, C.Y. Ma, Food Hydrocolloids. **2008**, *22*, 560.
(2) Y. Hua, S.W. Cui, Q. Wang, Food Hydrocolloids. **2003**, 17, 889.

28) Purification and characterization of a recombinant histidine-tagged microbial collagenase

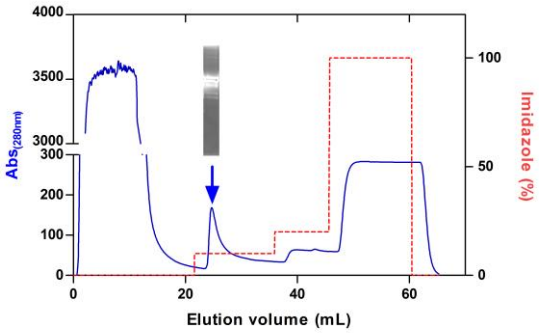
Lúcia Sabala, Ana Sofia Duarte, Ana Cristina Esteves, António Correia

Department of Biology & CESAM, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Microbial collagenases usually represent main factors of virulence; they provide microbe penetration into host tissues and supply microorganisms with nutrients. The study of these enzymes is of great value for scientific, medical and biochemical purposes.

This investigation describes the purification and characterization of a collagenase synthesized by *Aeromonas hydrophila*. The gene was cloned in an *E. coli* expression vector. The enzyme was purified by affinity chromatography on a HisTrap column. The apparent molecular weight was determined by SDS-PAGE. The enzyme's activity and storage stability were assessed by zymography.

SDS-PAGE analysis as well as zymography analysis showed the presence of several protein bands with proteolytic activity suggesting autoproteolysis of the enzyme, a process that has been described for other microbial collagenases. In order to confirm this fact, we have added EDTA, an inhibitor of the enzyme activity, indicating that it is a metalloprotease. Finally, enzyme specify was investigated by type I collagen digestion. The digestion of the synthetic peptide FALGPA was also carried out and data was compared to data obtained with a commercial collagenase.



Acknowledgments
Thanks are due to FCT (BPD/38008/2007 and BPD/46290/2008)

29) Toxicity of Ionic Liquids towards Vibrio fischeri

Pedro R. F. Silva[1], Sónia P. M. Ventura[1], Joana L. Pereira[2], Fernando Gonçalves[2], João A. P. Coutinho[1]

[1]*CICECO Chemistry Department, University of Aveiro, Aveiro, Portugal*
[2]*CESAM, Biology Department, University of Aveiro, Aveiro, Portugal*

Ionic Liquids (ILs) are an important and interesting group of compounds, composed by a large organic cation with different side chains and an organic or inorganic anion. They are liquid salts characterized by low vapor pressures, high chemical and thermal stabilities and solvent properties [1, 2]. Those properties, associated to their negligible vapor pressure, make them great alternative compounds for organic volatile compounds. Despite those "green" properties of ILs, they present water solubility large enough to affect living organisms [1, 3]. The possibility of discharging ILs into the environment through waste water streams is a real concern and the study of the potential effects of these compounds on aquatic ecosystems is still scarce. This study was accomplished to verify the toxicity of some ILs using a standard toxicological test widely used known as Microtox®, which is performed towards the marine bioluminescent bacteria, formerly known as Photobacterium phosphoreum (Vibrio fischeri). Several ILs' structures were tested, based in different imidazolium-based ILs, quaternary phosphonium-based ILs and quaternary ammonium-based ILs.

In general, the luminescent bacteria was negatively affected by all the IL structures (cations, anions and alkyl chain length). As a result, the usage of ILs in industrial activities must be done carefully due to their toxicity which may have severe repercussions in aquatic species and thus in trophic food web.

References

[1] Ventura, S. P. M.; Gonçalves, A. M. M.; Gonçalves, F.; Coutinho, J. A. P., *Aquatic Toxicology*, (2010) **96**,
[2] Ranke, J.; Stolte, S.; Stormann, R.; Arning, J.; Jastorff, B., *Chemical Reviews*, (2007) **107**, 2183.
[3] Thi, P. T. P.; Cho, C. W.; Yun, Y. S., *Water Res.*, (2010) **44**, 352.

30) Estudo de interacções ao nível molecular de nanopartículas com modelos de membrana celular

C. M.Mendonça*, A. S. Pereira, S.O. Pereira, T. Trindade e A. Barros-Timmons
Departamento de Química-CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal
**Mendonca@ua.pt*

Os materiais nanoestruturados têm sido investigados e aplicados em diversas áreas, nomeadamente em biotecnologia (*nanobiotecnologia*) e medicina (*nanomedicina*). A par do interesse crescente que estes materiais suscitam, existem igualmente preocupações relativamente aos riscos eventualmente associados à sua utilização, pelo que existe igual interesse em investigar efeitos adversos sobre sistemas biológicos. (1) O desenvolvimento de modelos laboratoriais que contribuam para este tipo de investigação é uma possibilidade de melhor se compreenderem as interacções nanopartícula/sistema biológico, sendo no entanto escassos os trabalhos neste domínio. Neste trabalho prepararam-se nanopartículas (NPs) de óxido de zinco e de ouro de acordo com métodos descritos na literatura. (2,3) A interacção das NPs com monocamadas de fosfolípidos do tipo dipalmitol fosfatidil colina (DPPC) e dipalmitol fosfatidil glicerol (DPPG) foi promovida recorrendo à técnica Langmuir-Blodgett, em que os filmes de Langmuir actuaram como modelos de membrana celular. (4) A partir destes estudos, foi obtida informação relativa ao tipo de interacções predominantes nestes sistemas modelo. Para tal, traçaram-se isotérmicas de tensão superficial (π) em função de área molecular dos fosfolípidos utilizando como subfase água ultra-pura e posteriormente NPs coloidais (Fig. 1).

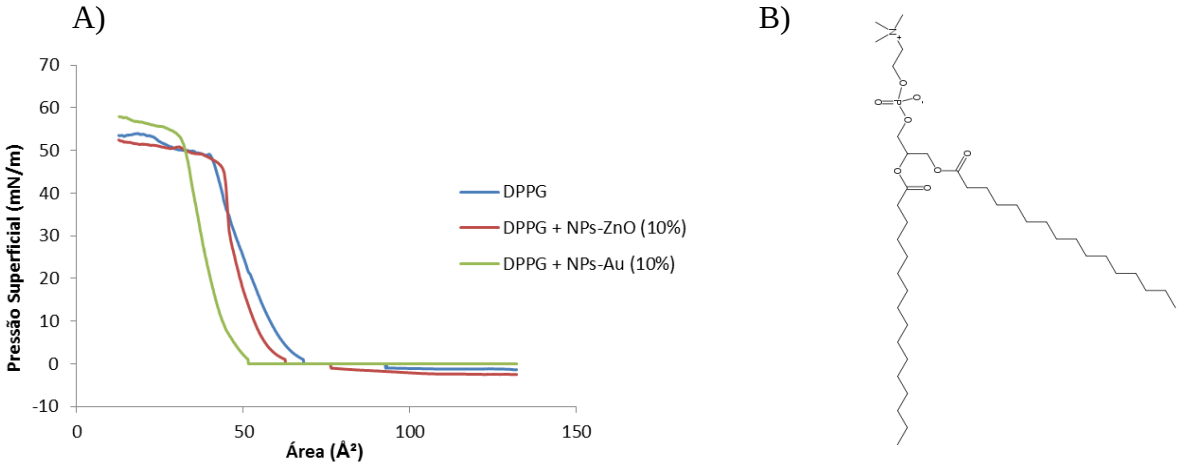


Figura 1: (A) Isotérmica de tensão de superfície-área do DPPG; (B) Fosfolípido DPPG

Agradecimentos:
A. S. Pereira agradece à FCT a bolsa de pós doutoramento SFRH/BPD/44398/2008;

Referências:

(1) Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. *Science* **2006,** 311, 622.
(2) Ocaña,M.;Peter-Hsu, W.; Matijevié, E. *Langmuir* **1991**, 7, 2911-2916
(3) Enüstün, B. V.; Turkevich, *J.; Am Chem Soc*, **1963**,85, 21
(4) Pavinatto, A.; Pavinatto, F.; Barros-Timmons, A.; Oliveira, O. *ACS applied Materials & Interfaces* **2010,** 2, 246-251.

31) Produção de fibras poliméricas por electrofiação utilizando líquidos iónicos

Nuno M. G. Sardo[a], Ana Rita R. Teles[a], Mara G. Freire[a], José A. Lopes da Silva[b] e João A. P. Coutinho[a*]

[a]*Departamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal*
[b]*QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal*

Nos últimos anos os líquidos iónicos (LIs) têm sido alvo de um crescente interesse devido às suas propriedades únicas, pois apresentam uma temperatura de fusão abaixo dos 100ºC, e sendo, muitas das vezes, líquidos à temperatura ambiente. A sua elevada capacidade de solvatação para diferentes compostos, pressões de vapor negligenciáveis, o facto de não serem inflamáveis, entre outras propriedades que estes apresentam, têm contribuído para o seu estudo como possíveis alternativas aos solventes orgânicos voláteis commumente utilizados, e em particular, na dissolução de biopolímeros como a celulose.

Neste trabalho utilizou-se o LI acetato de etilimidazólio, $[C_2mim][CH_3CO_2]$, para a dissolução de celulose, com o objectivo de obter nanofibras por electrofiação. Foram estudados vários parâmetros, tais como o tempo de dissolução, concentração de celulose, e celulose de várias origens, de modo a optimizar o tamanho e morfologia das fibras obtidas durante o processo. As fibras formadas foram analisadas através de diversas técnicas de microscopia e espectroscópicas, como MOP (microscopia óptica com luz polarizada), SEM (microscopia electrónica de varrimento), FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformadas de fourier) e DRX (difracção de raios-X).

Os resultados obtidos permitem concluir que é possível obter fibras de celulose da ordem dos nanómetros por electrofiação, utilizando para tal solventes não voláteis e menos nefastos para o meio ambiente.