

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Relatório sobre a Unidade Curricular:

**Biologia Aplicada
de Eucariontes Unicelulares**

*Conhecer a evolução da diversidade biológica,
bioquímica e molecular em eucariontes unicelulares
para melhor entender o seu potencial biotecnológico*

por

João Carlos Serafim Varela

Professor Associado

Faro

2024

*Provas de agregação a apresentar à Universidade do Algarve, de acordo com o disposto
pelo Decreto-Lei n.º 239/2007 de 19 de junho*

Relatório de Unidade Curricular

João Varela, 2024

Relatório do programa da unidade curricular de Biologia Aplicada de Eucariontes Unicelulares, conteúdos programáticos e metodologias de ensino e aprendizagem, de acordo com o previsto na alínea b) do artigo 5º do Decreto-Lei nº 239/2007 de 19 de junho. A unidade curricular apresentada está inserida no ramo de conhecimento de Ciências Biotecnológicas da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade do Algarve.

Aos meus pais, irmã e sobrinhas

Aos meus professores, colaboradores e alunos que me ensinaram tudo o que sei

Aos meus irmãos franciscanos que me ajudam todos os dias a ser uma melhor pessoa

*Hva auk boteiþ mannan, jabai gageigaiþ þana fairhvu allana jah gasleiþeiþ sik saiwalai seinai?*¹

τί γὰρ ὠφελεῖ ἄνθρωπον κερδῆσαι τὸν κόσμον ὅλον καὶ ζημιωθῆναι τὴν ψυχὴν αὐτοῦ?

For what shall it profit a man, if he shall gain the whole world, and lose his own soul?

Mc 8, 36

¹ Texto em gótico da bíblia traduzida por Wulfila, missionário que evangelizou os godos — os quais vieram a conquistar a Península Ibérica e a Itália — e respetiva tradução em grego antigo e em inglês moderno. A influência dos visigodos em Portugal ainda se faz sentir em topónimos como Gondomar e em palavras atuais para acepipes como “tapas”. Conhecer a história é compreender o nosso presente para melhor prever o futuro.

Índice

Table of Contents

1. Introdução.....	5
2. Lecionação da Unidade Curricular	8
2.1 Enquadramento e justificação da necessidade da unidade curricular	8
2.2 Cursos alvo.....	9
2.3 Idiomas	9
2.4 Área Científica.....	9
2.5 ECTS e horas de lecionação	9
2.6 Precedências e conhecimentos prévios recomendados	10
2.7 Objetivos de aprendizagem.....	11
2.8 Conteúdos programáticos	11
2.8.1 Aulas teóricas	12
2.8.2 Aulas Teórico-Práticas	16
2.8.3 Aulas Práticas e Laboratoriais	17
2.8.4 Seminários.....	18
2.9 Metodologia de ensino (avaliação incluída).....	18
2.10 Coerência das metodologias de ensino com os objetivos de aprendizagem	19
2.11 Bibliografia.....	19
2.11.1 Bibliografia principal.....	19
2.11.2 Bibliografia auxiliar	21
3. Considerações Finais	21

1. Introdução

A vinda para a Universidade do Algarve, em 1998, fez com que o candidato alterasse o foco da sua investigação e se dedicasse à biotecnologia de microalgas, após ter trabalhado em virologia, leveduras e células de mamíferos. Esta oportunidade foi-lhe dada pela Professora Leonor Cancela, que deu a possibilidade de iniciar esse tipo de investigação em conjunto com a empresa Necton. Esta é a companhia com maior longevidade da Europa no sector de produção industrial de microalgas; para conseguir tal feito, esta companhia tem traçado objetivos claros no que respeita ao desenvolvimento de novos produtos através de atividades de I&D em colaboração com a academia. Esta colaboração cimentou-se ao longo do tempo e produziu os seus frutos, com vários projetos científicos, tecnológicos e de inovação, tendo sido coroada com uma cooperação com mais empresas portuguesas no sector produtivo das algas, como a Allmicroalgae e Algaplus, bem como empresas de rações, como a Sparos. Este esforço colaborativo culminou, recentemente, com a formação do Laboratório Colaborativo GreenCoLab.

Esta junção da academia e o mundo empresarial impeliu-o a desenhar a unidade curricular (UC) *Biologia Aplicada de Eucariontes Unicelulares*. A UC atrás referida tem como público-alvo alunos graduados, em especial aqueles em fase de doutoramento. Por sua vez, o objetivo principal da UC aqui proposta é apresentar e discutir conceitos de biologia e bioquímica, com uma perspetiva evolutiva, que são essenciais para melhor compreender a enorme biodiversidade dos eucariontes unicelulares, os requisitos para o seu cultivo e o seu aproveitamento biotecnológico.

Infelizmente, por razões de certa inércia do ensino secundário, ainda se ensina aos alunos que a biodiversidade dos grandes grupos de pro- e eucariontes pode ser classificada em cinco reinos tal como proposto por Robert Whittaker (Hagen, 2012), apesar de se reconhecer a existência de conceitos mais recentes, como os três domínios da vida. Embora as limitações da proposta de Whittaker sejam evidentes, tal como a ideia da existência de reinos “funcionais”, ele introduziu o conceito de “protista”, que incluiria a maior parte dos organismos eucariontes unicelulares num único reino com o mesmo nome. A aparente simplicidade do sistema de cinco reinos é um atrativo inegável e que,

em parte, explica a manutenção desta hipótese no ensino de biologia do 11º ano, mas para alunos universitários, este conceito é, obviamente, insuficiente.

Atualmente, com a explosão da elucidação a nível genómico de organismos com histórias evolutivas diversas tem contribuído para o desenvolvimento de classificações alternativas, em que Patrick Keeling e Thomas Cavalier-Smith, e respetivas equipas, pontificaram. Em particular, Keeling e colaboradores têm realizado um trabalho de notável qualidade, cujos resultados têm sido essenciais para (re)desenhar uma árvore da vida mais “realista”, em que os conceitos de clade e monofilia tornaram-se fundamentais para estabelecer novos *taxa* das grandes linhagens filogenéticas (cf. Keeling, 2019; Burki et al., 2020) — por vezes, designados por “megagrupos”. Esta novo entendimento da biodiversidade, em especial dos eucariontes unicelulares, tem sido corroborado por evidências não só moleculares, frequentemente aplicadas à filogenia e genómica comparada, como também bioquímicas. Deste novo conhecimento, ficou claro que os termos “protista” e “alga”, embora usados tão frequentemente, não refletem o processo evolutivo, mas são apenas termos de conveniência. Tal ficou particularmente evidente no estudo de eucariontes unicelulares fotossintéticos em que a aquisição da capacidade de fotoautotrofia se inicia com a captura de cloroplastos. Esta aquisição não seria só por processos como a fagocitose, mas também por mizocitose (Moog & Mayer, 2017), em que o predador não ingere a sua presa, mas antes literalmente suga o conteúdo celular desta última, incluindo os seus cloroplastos, rejeitando as membranas plasmáticas e eventuais coberturas celulares, tais como escamas, tecas ou paredes celulares.

Este fenómeno de roubo de cloroplastos alheios (designada por “cleptoplastia”) encontra-se disseminado pela árvore da vida, que é realizado tanto por eucariontes unicelulares simples de diferentes linhagens evolutivas, como mesmo em, pelo menos, um grupo de metazoários pertencentes à clade *Sacoglossa* (Laetz & Wägele, 2017). Mais ainda, grupos que antes se julgava serem exclusivamente heterotróficos, como os ciliados, é frequente encontrar, em especial em águas oligotróficas (por ex., charcos de água doce), eucariontes unicelulares que retiveram os cloroplastos das suas presas (cf. Johnson, 2011). Por outras palavras, a aquisição da capacidade fotossintética tem sido bem mais frequente do que antes se pensava, o que tem implicações nas atuais classificações taxonómicas e no nosso conceito do que é uma “microalga”.

Este conhecimento é essencial para entender não só as histórias evolutivas, mas também prever como uma determinada microalga pode e deve ser cultivada, de modo a aproveitar o seu potencial biotecnológico (Carneiro et al., 2022; Schüler et al., 2022). Por exemplo, os dinoflagelados são particularmente difíceis de crescer em laboratório. Além de serem extremamente sensíveis ao stress mecânico (causado, por ex., por bolhas de ar e agitação), muitos deles têm relações tróficas complexas, que implicam não só o cultivo da sua presa, mas também da presa da presa, sem a qual a presa capturada pelo dinoflagelado não cresce em laboratório (Wisecaver & Hackett, 2010).

Além disso, o conhecimento da evolução dos grandes grupos de eucariontes unicelulares permite igualmente prever o seu comportamento como predadores de microalgas, como também os comprimentos de onda de luz mais adequados para suportar o seu crescimento ou, ainda, para induzir metabolitos de interesse, tais como carotenoides, ácidos gordos polinsaturados e polissacáridos bioativos (Schulze et al., 2017). Tais conhecimentos são essenciais para o cultivo das microalgas em si, para a valorização da biomassa produzida e para a gestão de contaminantes biológicos.

De facto, um dos grandes problemas atuais das empresas produtoras de microalgas é a ocorrência de micropredadores e/ou ecto- e endoparasitas em culturas industriais de microalgas. Além disso, há o problema de microrganismos competidores (normalmente outras microalgas de crescimento mais rápido) ou patogénicos (por ex., bactérias *Vibrionaceae*) para organismos que se alimentam de microalgas. Todas estas entidades biológicas microscópicas podem causar grandes prejuízos às empresas, ou por colapsos das culturas ou por tornarem inviável a comercialização da biomassa algal.

Em conclusão, um melhor conhecimento da biologia destes microrganismos, seguindo uma lógica evolutiva, será essencial para melhor tirar partido nas suas aplicações biotecnológicas. Dentro destas, podemos citar a produção de novos alimentos e rações para a aquacultura, design e implementação de biorrefinarias à base de microalgas para maximizar o valor da biomassa e a geração de frações de alto valor e ricas em biocompostos com aplicação industrial de uma dada classe bioquímica, nomeadamente proteína, ácidos gordos polinsaturados, polissacáridos e vitaminas.

2. Lecionação da Unidade Curricular

2.1 Enquadramento e justificação da necessidade da unidade curricular

A produção industrial de microalgas e o aproveitamento da biomassa algal em termos das suas várias aplicações integram-se num sector produtivo *sui generis*. É um sector que tem algumas semelhanças com a agricultura, nomeadamente no que respeita à utilização de organismos fotossintéticos que necessitam de fertilizantes, CO₂ e água para o seu cultivo. Porém, é um sector que, em geral, requer maiores conhecimentos técnicos e investimentos de capital, acarretando também maiores custos de operação. De facto, a produção industrial de microalgas é ainda um sector produtivo na sua infância, em especial quando se deseja aumentar a sua escala, já que tal tem um historial que só se iniciou verdadeiramente a partir dos anos 50 do século passado. Embora se tenha progredido fortemente no conhecimento da biologia, taxonomia e cultivo industrial de microalgas, ainda há muito para investigar e adquirir o necessário *know-how* para que esta indústria passe de uma atividade empresarial de nicho para uma indústria de primeira linha, essencial para desenvolver o tecido produtivo de Portugal. Assim, torna-se essencial desenvolver e aprofundar os conhecimentos sobre a biologia dos eucariontes unicelulares e suas aplicações a nível de programas doutorais. A falta de estudantes graduados e doutores com experiência relevante é fortemente sentida quando as empresas ou laboratórios colaborativos do setor desejam recrutar pessoal qualificado. Em geral, ou os candidatos não possuem os requisitos pretendidos, ou o candidato provém, em geral, de países fora da Europa. Neste último caso, é frequente o candidato desistir, por vezes, por questões culturais ou de preferência do candidato, em que este prefere outros países ocidentais para se fixar. Assim, torna-se urgente a formação de doutorados em Portugal para colmatar esta falta de pessoal qualificado e especializado em microalgas, tendo excelentes conhecimentos de biologia, fisiologia, bioquímica e modos de cultivo desde a escala laboratorial à industrial. Igualmente, deverão ter bons conhecimentos de gestão de contaminantes biológicos e implementação de biorrefinarias para o melhor aproveitamento da biomassa algal e maximização do seu valor.

2.2 Cursos alvo

Devido à justificação atrás mencionada, assim é proposta a lecionação da unidade curricular *Biologia Aplicada de Eucariontes Unicelulares* nos programas doutorais de Ciências Biotecnológicas, Ciências Biológicas, e das Ciências do Mar e da Terra e do Ambiente da Universidade do Algarve. Estes programas doutorais inserem-se na Faculdade de Ciências e Tecnologia, estando integrados no Departamento de Ciências Biológicas e Bioengenharia.

2.3 Idiomas

O idioma de lecionação proposto será o inglês, revertendo para português caso todos os estudantes de doutoramento sejam portugueses ou que consigam conversar e escrever nesta última língua a nível C1.

2.4 Área Científica

De acordo com a Classificação Nacional das Áreas de Educação e Formação, a área científica da UC será na área de estudo 42 - *Ciências Biológicas*, mais concretamente na área de educação e formação 421 - *Biologia e Bioquímica*.

2.5 ECTS e horas de lecionação

De acordo com o regulamento 131 / 2021, de 10 de Fevereiro da Universidade do Algarve que regula a atribuição de créditos às unidades curriculares, é proposto que a UC *Biologia Aplicada de Eucariontes Unicelulares* corresponda a um esforço de **6 ECTS**, isto é, 156 (6 x 26h) horas totais. Além disso, segundo o nº 13 do artigo 3º do mesmo regulamento, para UCs de 3º ciclo, indica-se que as horas de contacto não sejam superiores a 15% das horas totais.

Assim sendo, e escolhendo a modalidade de ensino presencial, a distribuição das horas de lecionação por tipologia de aula encontra-se indicada na **Tabela 1**. A UC deverá ser lecionada durante 8 semanas, com 1h de aulas teóricas por semana, totalizando 8 horas de contacto em termos desta tipologia, propondo-se 30h para trabalho / estudo autónomo e preparação para a avaliação.

Tabela 1 - Horas de lecionação

	Duração de aula (h)	Nº de aulas	Contacto (h)	Trabalho Autónomo e Avaliação (h)	Horas Totais	Horas de contacto (%)
Teóricas	1	8	8	30	38	21,1
Teórico-Práticas	1	4	4	20	24	16,7
Práticas e Laboratoriais	2	4	8	68	76	10,5
Seminários	1	2	2	16	18	11,1
Totais	-	18	22	134	156	14,1

Para complementar, aprofundar e discutir os conteúdos das aulas teóricas, é também proposta a lecionação de 1 aula teórico-prática de 1h em cada duas semanas e de 1 seminário em cada 4 semanas, totalizando 4 e 2h de contacto, respetivamente. O trabalho autónomo e preparação para a avaliação desta tipologia deverá ser realizado em 20 e 16h, respetivamente. Finalmente, os conceitos de todas as aulas com as tipologias atrás referidas deverão ser consolidados através de 4 aulas práticas e laboratoriais de 2h, com 8h de horas totais de contacto. Tal corresponderá a um esforço de trabalho autónomo e preparação para avaliação de 68h. Estas horas deverão ser aproveitadas para que os alunos expandam as experiências e trabalhos práticos propostos durante as horas de contacto em projetos concretos de investigação que poderão ser aplicados aos objetivos da sua dissertação de doutoramento. Em conclusão, a horas de contacto em % terão uma média de 14,1 %, abaixo do valor máximo de 15%.

2.6 Precedências e conhecimentos prévios recomendados

Uma vez que a UC proposta é do 3º ciclo, não se recomenda o estabelecimento de precedências. No entanto, é recomendado que os alunos tenham conhecimentos básicos de biologia celular e molecular, taxonomia, microbiologia e bioquímica.

2.7 Objetivos de aprendizagem

Face à justificação e enquadramento expostos na seção 2.1, a UC de *Biologia Aplicada de Eucariontes Unicelulares* terá os seguintes objetivos de aprendizagem e competências a adquirir pelos alunos do 3º ciclo:

- i. Compreender o historial das classificações da biodiversidade dos eucariontes unicelulares, partindo da classificação de 5 reinos de Whittaker até às atuais grandes linhagens definidas por Cavalier-Smith, Keeling e colaboradores
- ii. Ter uma compreensão abrangente das grandes linhagens evolutivas dos eucariontes unicelulares para melhor entender a sua biodiversidade;
- iii. Saber quais os atuais critérios utilizados para definir os grandes grupos de eucariontes, nomeadamente morfológicos, bioquímicos, filogenéticos e filogenómicos;
- iv. Saber quais os modos de cultivo de eucariontes unicelulares em ambiente industrial, incluindo vários tipos de trofia, equipamentos industriais de cultivo e respetivas vantagens e desvantagens;
- v. Compreender quais as aplicações biotecnológicas de eucariontes unicelulares, com particular ênfase, em microalgas;
- vi. Entender quais são as atuais estratégias de melhoramento de estirpes de eucariontes unicelulares;
- vii. Saber como a biomassa destes microrganismos pode ser valorizada através de processos de biorrefinaria;
- viii. Compreender a importância de microbiomas associados às algas para melhorar a sua produtividade, valor final da biomassa e evitar o colapso de culturas industriais; e
- ix. Estimular o sentido crítico e o trabalho autónomo do aluno de 3º ciclo.

2.8 Conteúdos programáticos

O programa da UC de *Biologia Aplicada de Eucariontes Unicelulares* divide-se em conteúdos de aulas teóricas, teórico-práticas, práticas e seminários.

2.8.1 Aulas teóricas

As aulas teóricas terão como principal objetivo introduzir temas relevantes e dar pistas de estudo e investigação aos alunos de doutoramento. Assim sendo, são propostos os seguintes temas principais:

- a. Biodiversidade de Eucariontes Unicelulares
 - i. Historial das classificações dos grandes grupos de eucariontes
 - ii. Linhagem *Archaeplastida* (*Glaucophyta*, *Rhodophyta* e *Chlorophyta*)
 - iii. Linhagem SAR (*Stramenopiles*, *Alveolata* e *Rhizaria*)
 - iv. Linhagens *Haptista* e *Cryptista* (ex-Hacrobia)
 - v. Linhagem *Excavata*
 - vi. Linhagem *Amoebozoa*
- b. Sistemas de cultivo de Eucariontes Unicelulares
 - i. Sistemas abertos
 - ii. Sistemas fechados
 - iii. Sistemas de recolha de biomassa
- c. Aplicações biotecnológicas de eucariontes unicelulares e sua biomassa
 - i. Alimentação humana
 - ii. Alimentação animal
 - iii. Bioestimulantes
 - iv. Tratamento de efluentes
 - v. Compostos bioativos
- d. Bioprospeção e melhoramento de estirpes de eucariontes unicelulares
 - i. Tecnologias de bioprospeção de microalgas
 - ii. Tecnologias de mutagénese aleatória e dirigida
 - iii. Metodologias de seleção e isolamento de mutantes
- e. Biorrefinarias
- f. Microbiomas associados a microalgas
 - i. Associações de microalgas e respetivo microbioma
 - ii. Micropredadores
 - iii. Microparasitas
 - iv. Competidores e patógenos
 - v. Metodologias de gestão de contaminantes biológicos

O ponto a. será dado nas três primeiras aulas em que serão dados históricos sobre a evolução dos grandes grupos de eucariontes, partindo da classificação de 5 reinos de Whittaker, passando pela classificação de 6 reinos de Cavalier-Smith com a introdução do Reino Cromista e da hipótese “Chromalveolata” e “Hacrobia”. Após esta exposição, será dada uma visão atual dos grandes grupos (megagrupos) de eucariontes, nomeadamente as linhagens Archaeplastida, SAR, Haptista, Cryptista, Excavata e Amoebozoa, tal como sugerido inicialmente por Patrick Keeling e colaboradores, mas mais recentemente refinado por Fabien Burki, Alastair Simpson e colaboradores, através dos recentes avanços da filogenia e filogenómica.

Na linhagem Archaeplastida, será referida a endossimbiose primária entre um eucarionte predador e uma cianobactéria com clorofila *b* como ancestral comum desta linhagem que teria grandes semelhanças com as Glaucophyta e os seus cianelos, mas que, com a perda gradual da camada de peptidoglicano entre as duas membranas do cloroplasto e a perda gradual de pigmentos, como as ficobilinas, deu origem às Rhodophyta e às Chlorophyta.

Quanto à linhagem SAR, será salientado que esta corresponde à junção dos Stramenopiles (Ochrophyta), os quais incluem as algas castanhas (Phaeophyta), diatomáceas (Bacillariophyta), algas douradas (Chrysophyta), pseudofungos (por ex., Oomycetes), entre outros, com os eucariontes alveolados (Alveolata) e uma nova linhagem morfológicamente heterogénea designada por Rhizaria (por ex., Cercozoa e Radiolaria). Será feita também uma discussão sobre as recentes evidências a favor deste megagrupo que refuta, em parte, a hipótese “Chromalveolata” tal como proposta por Cavalier-Smith.

Em seguida, será dado relevo à recente refutação da linhagem “Hacrobia” e a sua substituição por duas linhagens: Cryptista, que inclui em larga medida as Cryptophyta, e Haptista, que contém as Haptophyta. As primeiras aparentemente são mais aparentadas com a linhagem SAR e as Cryptophyta com a linhagem Archaeplastida.

Pontos de discussão

Os alunos serão encorajados a saber e discutir as seguintes questões:

1. Quais as diferenças entre as propostas de Cavalier-Smith e colaboradores e as de Keeling e colaboradores?

2. *Por que razão a hipótese “Chromalveolata” é atualmente considerada como improvável?*

3. *Quais são as linhagens que apresentam maior biodiversidade? Quais são os mecanismos mais prováveis de terem tido tanto sucesso em termos qualitativos e quantitativos?*

O ponto b. será dado na 4ª aula, focando-se na discussão dos vários sistemas de cultivo abertos (por ex., raceways) e fechados (por ex., fotobiorreactores tubulares). Serão apresentados exemplos de cada tipo de sistema de cultivo laboratorial, piloto e industrial e vantagens e desvantagens de cada sistema. Será igualmente discutida a necessidade de se desenvolver sistemas de recolha mais sustentáveis que a atual centrifugação contínua industrial, que inclui, por exemplo, sistemas de flotação ou (eletro)floculação ou sistemas de (ultra)filtração por membranas.

Pontos de discussão

Os alunos serão encorajados a saber e discutir as seguintes questões:

- 1. Quais as vantagens e desvantagens de sistemas de produção abertos e fechados?*
- 2. Quais são as várias etapas num sistema de produção industrial de microalgas?*
- 3. Quais são as etapas com maior impacto em termo de custos de produção e porquê?*

No ponto c., dado na 5ª aula, explorar-se-á as diversas aplicações biotecnológicas de eucariontes unicelulares, com especial foco nas microalgas, embora haja outros microrganismos não fotossintéticos que têm sido aproveitados biotecnologicamente. Um dos exemplos possíveis são os traustocitridídeos, que pertencem à grande linhagem dos Stramenopiles, apesar da sua designação sugerir que seriam fungos, o que não corresponde à evidência atual no que respeita à sua origem evolutiva. Neste ponto, serão discutidas aplicações de microalgas para a alimentação de seres humanos e animais, tendo em conta a atual tendência do mercado para um consumo mais sustentável de proteína não animal. Será igualmente discutida a utilização de microalgas como fontes de bioestimulantes e, também, de biofertilizantes a partir de restos de biomassa considerados de menor qualidade. Sabe-se atualmente que as microalgas poderão ser fontes importantes de fitohormonas, aminoácidos e outros bioestimulantes que poderão melhorar a produtividade agrícola ou melhorar o aspeto de plantas interiores. Será também discutido o uso de microalgas no tratamento de

efluentes urbanos e (agro-)industriais e a utilização da biomassa como fonte de compostos bioativos como *leads* para produtos farmacêuticos ou como ingredientes de produtos cosméticos e/ou nutracêuticos.

Pontos de discussão

Os alunos serão encorajados a saber e discutir as seguintes questões:

- 1. Por que razão as microalgas podem ser utilizadas no tratamento de efluentes?*
- 2. Que microalgas podem atualmente utilizadas na alimentação humana e porquê?*
- 3. O que são traustocitrídios? Podem eles ser considerados microalgas? Justifique.*
- 4. Pensa que seja sustentável usar microalgas para a produção de biocombustíveis?*

O ponto d. (6ª aula) focar-se-á na necessidade de melhorar as estirpes comerciais de microalgas não só em termos de crescimento e produtividade da biomassa, mas também no que respeita à sua composição bioquímica. Para o efeito, serão discutidas técnicas clássicas de isolamento de células em placa até métodos de rastreio de alto débito como, por exemplo, a utilização de técnicas de citometria de fluxo com sorteamento de células ativado por fluorescência (FACS). Serão também discutidas técnicas de geração de mutantes, sejam elas por mutação espontânea, mutagénese física ou química, ou ainda mutagénese dirigida com a utilização, por exemplo, do sistema de edição de genes CRISPR-Cas9.

Pontos de discussão

Os alunos serão encorajados a saber e discutir as seguintes questões:

- 1. Que técnicas podem ser utilizadas no melhoramento de eucariontes unicelulares utilizados na indústria?*
- 2. Quais são as vantagens e desvantagens de se usar técnicas de mutagénese dirigida para a geração de estirpes mutantes de microalgas?*
- 3. Quais são os atuais constrangimentos que impedem a seleção de estirpes de microalgas melhoradas?*

O ponto e. (7ª aula) corresponderá à construção de biorrefinarias para o aproveitamento e valorização da biomassa algal através da produção de vários fluxos de subprodutos que provêm da homogenização por alta pressão seguida de hidrólise enzimática para maximizar a recuperação de ingredientes de alto valor como aminoácidos, pigmentos (por ex., ficobilinas), ácidos gordos polinsaturados, esteróis e terpenoides.

Pontos de discussão

Os alunos serão encorajados a saber e discutir as seguintes questões:

- 1. O que são biorrefinarias e para que servem?*
- 2. Como podem as biorrefinarias à base de microalgas ser implementada?*
- 3. Quais seriam os passos básicos de um fluxo de sub-produtos de uma microalga com a qual esteja a trabalhar?*

Finalmente, no ponto f. (8ª e última aula teórica), será abordado o estudo de microbiomas associados a microalgas sejam eles pro- ou eucariontes, a introdução do conceito de ficosfera e as relações ecológicas entre todos os componentes do holobionte, a ocorrência de micropredadores e microparasitas, competidores e patógenos em culturas de algas industriais. Neste ponto, serão também abordadas metodologias de gestão de contaminantes biológicos, com a utilização de processos físicos, químicos e biológicos para a mitigação ou eliminação do contaminante, evitando o colapso de culturas de algas industriais.

Pontos de discussão

Os alunos serão encorajados a saber e discutir as seguintes questões:

- 1. O que entende por ficosfera, holobionte, microbioma, microbiota e metagenomas?*
- 2. Quais são as interações que um eucarionte unicelular poderá ter com o seu microbioma?*
- 3. Quais são as aplicações do estudo do microbioma na produção industrial de microalgas?*

2.8.2 Aulas Teórico-Práticas

As aulas teórico-práticas terão dois objetivos:

- a. consolidação dos conteúdos dados nas teóricas e práticas; e
- b. design e discussão de um projeto de investigação em eucariontes unicelulares após a identificação de desafios que atualmente constroem o desenvolvimento do sector de produção industrial de eucariontes unicelulares, em particular de microalgas.

Assim, é proposto os seguintes conteúdos para as aulas teórico-práticas:

- a. Discussão de artigos sobre as grandes linhagens evolutivas e métodos filogenómicos para o seu estudo e identificação taxonómica (1ª e 2ª aulas teórico-práticas).
- b. Discussão de artigos sobre bioprospeção, melhoramento de estirpes e aplicações biotecnológicas de eucariontes unicelulares e a sua biomassa (3ª aula teórico-prática).
- c. Discussão de artigos sobre biorrefinarias e microbiomas associados às algas (4ª aula teórico-prática).
- d. Discussão da conceção e evolução dos projetos propostos pelos alunos na 1ª aula prática.

2.8.3 Aulas Práticas e Laboratoriais

Devido ao baixo número de horas de contacto ($4 \times 2h = 8h$) e o elevado número de horas de trabalho autónomo (68h), os alunos serão desafiados na 1ª aula prática de desenhar e executar uma experiência focada nos seguintes temas:

- a. Isolamento e identificação de eucariontes unicelulares por métodos morfológicos e moleculares, incluindo isolamento de DNA, sequenciação e tratamento bioinformático e filogenético / filogenómicos obtido;
- b. Metodologias de melhoramento de estirpes de eucariontes unicelulares com particular ênfase na geração, rastreio e caracterização de estirpes mutantes com fenótipos de interesse para a indústria
- c. Biorrefinarias à base de biomassa microalgal com a seleção de microalgas adequadas para um fim industrial e conceção da *pipeline* necessária para maximizar a obtenção do ingrediente / biocomposto pretendido.
- d. Estudo de microbiomas associados às microalgas com a inclusão de plataformas de sequenciação de nova geração para obtenção de amplicões específicos ou de (meta)genomas por sequenciação completa de genomas.

Nas restantes aulas práticas, será discutida a implementação do projeto selecionado pelo aluno, que incluirá a apresentação de resultados obtidos durante as horas de trabalho autónomo e a discussão de possíveis soluções para problemas deparados pelos alunos. Serão também incluídas demonstrações de técnicas que forem consideradas como essenciais,

dependendo dos temas escolhidos pelos alunos. Caso o número de alunos o justifique, poderá ser permitido a formação de grupos para estimular o trabalho em equipa.

2.8.4 Seminários

O conteúdo dos seminários não é estabelecido à priori de modo a permitir uma maior flexibilidade dos temas selecionados para esta tipologia. Para a implementação desta tipologia, para a 1ª aula, serão convidados investigadores e/ou estudantes de doutoramento para darem uma visão atualizada da aplicação de conhecimentos biológicos e bioquímicos para o cultivo e utilização de biomassa algal nas suas várias vertentes. Eventualmente, poderão ser também apresentados e discutidos algumas tarefas e resultados dos próprios projetos de doutoramento, nomeadamente no que respeita a eventuais dificuldades e constrangimentos que os alunos encontraram na execução do projeto proposto. Na última aula desta tipologia, os alunos apresentarão oralmente os resultados obtidos após a execução do projeto selecionado pelo aluno.

2.9 Metodologia de ensino (avaliação incluída)

O conteúdo teórico será apresentado em aulas teóricas em que se estimulará a intervenção dos alunos e estimular o sentido crítico dos mesmos. Para o efeito, será dada uma perspetiva histórica e evolutiva da biodiversidade dos eucariontes unicelulares. Assim, os alunos terão uma melhor compreensão do que foi alterado e quais as razões dessas alterações. O conteúdo das aulas teóricas será apoiado por aulas teórico-práticas, que farão a ponte com os conteúdos práticos. Finalmente, as aulas de seminário darão uma perspetiva atual de alguns aspetos mencionados nas aulas teóricas, teórico-práticas e práticas.

A avaliação será feita através de, uma apresentação e discussão oral da conceção e implementação de um projeto proposto nas aulas práticas laboratoriais e/ou aulas teórico-práticas. Esta apresentação e discussão terá lugar numa aula com tipologia Seminário, como indicado anteriormente. Igualmente será avaliado um relatório do projeto implementado e respetivos resultados. Caso o projeto pretendido exceda as horas de trabalho autónomo da unidade curricular, será permitido o uso de dados obtidos anteriormente tanto pelo aluno como pela equipa docente. A inclusão de um exame escrito poderá ser, eventualmente,

considerada, caso o docente e/ou os alunos considerem tal medida vantajosa para estimular o estudo e a obtenção das competências recomendadas.

2.10 Coerência das metodologias de ensino com os objetivos de aprendizagem

As metodologias de ensino propostas adequam-se aos alunos de 3º ciclo, dada a reduzida percentagem de horas de contacto em relação às horas totais. Assim, considero que seja essencial que a lecionação seja distribuída por um total de 156h, com 134h de trabalho autónomo e avaliação. As aulas teóricas serão essenciais para os alunos terem o entendimento avançado da biodiversidade e o modo como o cultivo industrial destes microrganismos pode ser realizado e melhorado, já que os mesmos necessitam de ser “domesticados” para se adaptarem às condições de cultivo industriais. As aulas teóricas serão complementadas por aulas teórico-práticas e práticas no final de cada duas semanas, bem como por seminários, a cada 4 semanas de aulas. As metodologias de ensino desta unidade curricular visam estimular o trabalho autónomo com projetos concretos e de interesse para o aluno.

2.11 Bibliografia

2.11.1 Bibliografia principal

- Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D. V., Zlatogursky, V., Minh, B. Q., Radaykina, L. V., ... & Keeling, P. J. (2016). Untangling the early diversification of eukaryotes: a phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**: 20152802. DOI: 10.1098/rspb.2015.2802
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., & Simpson, A. G. (2020). The new tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **35**: 43-55. DOI: 10.1016/j.tree.2019.08.008
- Carneiro, M., Maia, I.B., Cunha, P., Guerra, I., Magina, T., Santos, T., Schulze, P.S.C., Pereira, H., Malcata, F.X., Navalho, J., Silva, J., Otero, A., Varela, J. (2022). Effects of LED lighting on *Nannochloropsis oceanica* grown in outdoor raceway ponds. *Algal Res.* **64**: 102685. DOI: 10.1016/j.algal.2022.102685.

Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **271**: 1251-1262.

Curtis, B. A., Tanifuji, G., Burki, F., Gruber, A., Irimia, M., Maruyama, S., ... & Archibald, J. M. (2012). Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* **492**: 59-65. DOI: 10.1038/nature11681

Johnson, M.D. (2011) Acquired phototrophy in Ciliates: A Review of Cellular Interactions and Structural Adaptations. *J. Eukaryotic Microbiology* **58**: 185-195. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2011.00545.x

Keeling, P. J. (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual review of plant biology* **64**: 583-607. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120144

Keeling, P.J. (2019) Combining morphology, behaviour and genomics to understand the evolution and ecology of microbial eukaryotes. *Phil. Trans. R. Soc. B* **374**: 20190085. DOI: 10.1098/rstb.2019.0085.

Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical reviews in plant sciences* **31**: 1-46.

Pereira, H.G., Schulze, P.S.C., Schüler, L.M., Santos, T, Barreira, L.A., Varela, J.C. (2018) Fluorescence activated cell-sorting principles and applications in microalgal biotechnology. *Algal Res.* **30**: 113-120. DOI: 10.1016/j.algal.2017.12.013.

Schüler, L., de Moraes, E.G., Trovão, M., Machado, A., Carvalho, B., Carneiro, M., Maia, I., Soares, M., Duarte, P., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., Varela, J. (2020). Isolation and characterization of novel *Chlorella vulgaris* mutants with low chlorophyll and improved protein contents for food applications. *Frontiers Bioeng. Biotechnol. – Ind. Biotechnol.* **8**, 469. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00469.

Schüler, L., Walter, J.M., Kato, H., Suzuki, H., Hulatt, C.J., Rautenberger, R., Navalho, S., Schmid, B., Varela, J., Kiron., V., Schulze, P. (2022). High-value compound induction by flashing light in *Diacronema lutheri* and *Tetraselmis striata* CTP4. *Biores. Technol. Rep.* **19**: 101158. DOI: 10.1016/j.biteb.2022.101158.

Schulze, P.S.C., Guerra, R., Schüler, L.M., Varela, J.C.S. (2017). Flashing LEDs for microalgal production. *Trends Biotechnol.* **35**: 1088-1101. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.07.011.

Trovão, M., Schüler, L.M., Machado, A., Bombo, G., Navalho, S., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., Freitas, F., Varela, J. (2022). Random mutagenesis as a promising tool for microalgal strain improvement toward industrial production. *Marine Drugs* **20**: 440. DOI: 10.3390/md20070440

2.11.2 Bibliografia auxiliar

Gangadhar, K.N., Rodrigues, M.J., Pereira, H., Gaspar, H., Malcata, F.X., Barreira, L., Varela, J. (2020). Anti-hepatocellular carcinoma (HepG2) activities of monoterpene hydroxy lactones isolated from the marine microalga *Tisochrysis lutea*. *Marine Drugs* **18**: 567. DOI: 10.3390/md18110567.

Hagen, J. B. (2012). Five kingdoms, more or less: Robert Whittaker and the broad classification of organisms. *BioScience* **62**: 67-74. DOI: 10.1525/bio.2012.62.1.11

Laetz, E.M.J., Wägele, H. (2017) Chloroplast digestion and the development of functional kleptoplasty in juvenile *Elysia timida* (Risso, 1818) as compared to short-term and non-chloroplast-retaining sacoglossan slugs. *PLOS One* **12**: e0182910. DOI: 10.1371/journal.pone.0182910

Moog, D., Maier, U (2018) Explaining the origin of three-membrane bound plastids in dinoflagellates and euglenophytes: kleptoplastidy via myzocytosis? *BioEssays* **40**, 1700224. DOI: 10.1002/bies.201700224.

Whittaker, R. (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**, 150-160. DOI: 10.1126/science.163.3863.150.

Wisecaver, J. H., & Hackett, J. D. (2010). Transcriptome analysis reveals nuclear-encoded proteins for the maintenance of temporary plastids in the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *BMC genomics*, **11**: 1-10. DOI: 10.1186/1471-2164-11-366.

3. Considerações Finais

A unidade curricular de *Biologia Aplicada de Eucariontes Unicelulares* pretende preencher uma lacuna que existe na atual docência da biodiversidade de microrganismos eucarióticos. Tenta aliar os conhecimentos da biologia, fisiologia, bioquímica e genética

molecular com as aplicações biotecnológicas da biomassa produzida a nível industrial. Tal é possível dadas as ligações do docente com a indústria portuguesa de produtores de microalgas, que permitem uma troca eficiente de conhecimentos entre a academia e indústria e de prioridades determinadas pelos próprios produtores industriais.

Estas prioridades podem ser a nível de treino de pessoal especializado para tarefas que são muito procuradas para melhorar os processos de produção e valorização da biomassa de microalgas. Para o efeito, é essencial que os alunos de 3º ciclo tenham conhecimentos de ciência fundamental destes microrganismos que depois poderão aplicar no cultivo destes microrganismos, incluindo a gestão e mitigação de contaminantes que poderão ter efeitos nocivos e drásticos na viabilidade comercial dos produtores. Com o efeito, o colapso e/ou a contaminação de culturas industriais tem-se tornado em um dos pontos onde é essencial obter novos conhecimentos, pois, devido aos elevados volumes envolvidos, acarretam graves prejuízos aos produtores.

Esta ligação entre a academia e a indústria é ainda reforçada pelo envolvimento do docente e alunos nos vários laboratórios colaborativos que envolvam a produção de microalgas (por ex., o GreenColab) com outros mais a jusante que pretendam desenvolver novos produtos para a aquacultura. Esta estratégia permitirá uma melhor adequação das competências a adquirir pelos alunos e os perfis de pessoal que a indústria pretende contratar a médio e longo prazo. Tal assegurará que os alunos terão uma maior possibilidade de serem absorvidos pelo tecido produtivo nacional ou, também, pela academia, caso desejem prosseguir uma carreira de investigação mais fundamental e/ou de docência no ensino superior.