

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2002.06.04</b>	(73) Titular(es): <b>FISH BIOTECH LTD.</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2001.06.29 US 893875</b>	<b>YIRMIYAHU 78 JERUSALEM 94467</b>	<b>IL</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2004.04.21</b>	<b>ISRAEL OCEANOGRAPHIC AND</b>	<b>IL</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.05.23</b> <b>164/2012</b>	(72) Inventor(es): <b>SHALOM ZEMACH</b>	<b>IL</b>
	<b>AMOS TANDLER</b>	<b>IL</b>
	<b>WILLIAM KOVEN</b>	<b>IL</b>
	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b>	
	<b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **UM PROCESSO PARA ARMAZENAR NEMÁTODOS ENRIQUECIDOS**

(57) Resumo:

UM PROCESSO PARA CONSERVAR E ARMAZENAR NEMÁTODOS TENDO UM VALOR ALIMENTAR ACRESCENTADO PARA USO POSTERIOR CONFORME NECESSÁRIO NA ALIMENTAÇÃO DE ORGANISMOS DE AQUACULTURA. NESTE PROCESSO, OS NEMÁTODOS SÃO ENRIQUECIDOS COM UM ADITIVO TAL COMO ÁCIDOS GORDOS ESSENCIAIS, VACINAS, HORMONAS, IMUNOESTIMULANTES, ISCOS, NUTRIENTES E PIGMENTOS. OS LIPOSSOMAS PODEM SERVER COMO MEIO PARA ALIMENTAR OS NEMÁTODOS COM OS ADITIVOS. OS NEMÁTODOS ENRIQUECIDOS SÃO ENTÃO DESIDRATADOS INDUZINDO UMA ANIDROBIOSE (DESIDRATAÇÃO) QUIESCENTE E ARMazenados PARA USO OFF-THE-SHELF CONFORME NECESSÁRIO. QUANDO REQUERIDOS PARA ALIMENTO, OS NEMÁTODOS DESIDRATADOS SÃO RE-HIDRATADOS E DADOS AOS ORGANISMOS DE AQUACULTURA.

**RESUMO****"UM PROCESSO PARA ARMAZENAR NEMÁTODOS ENRIQUECIDOS"**

Um processo para conservar e armazenar nemátodos tendo um valor alimentar acrescentado para uso posterior conforme necessário na alimentação de organismos de aquacultura. Neste processo, os nemátodos são enriquecidos com um aditivo tal como ácidos gordos essenciais, vacinas, hormonas, imunoestimulantes, iscos, nutrientes e pigmentos. Os lipossomas podem server como meio para alimentar os nemátodos com os aditivos. Os nemátodos enriquecidos são então desidratados induzindo uma anidrobiose (desidratação) quiescente e armazenados para uso "off-the-shelf" conforme necessário. Quando requeridos para alimento, os nemátodos desidratados são re-hidratados e dados aos organismos de aquacultura.

## DESCRIÇÃO

### "UM PROCESSO PARA ARMAZENAR NEMÁTODOS ENRIQUECIDOS"

#### CAMPO E ANTECEDENTES DO INVENTO

O presente invento relaciona-se com aquacultura e, mais particularmente, a um método para armazenamento "off-the-shelf" de nemátodos enriquecidos usados na alimentação de organismos de aquacultura tais como larvas de peixe e camarão.

O principal impasse no crescimento bem sucedido de peixe marinho com potencial comercial é a criação dos estádios de desenvolvimento inicial ou larvas. Durante este período, a mortalidade pode variar entre 60-100%, frequentemente devida a nutrição insuficiente ou pobre. Por exemplo, os viveiros dependem da provisão de alimento vivo ou zooplâncton para as larvas tais como rotíferos (*Brachionus plicatilis* ou outros *Brachianus* sp.) e camarão de água salgada (*Artemia* sp.). Estes constituintes do zooplâncton não representam a dieta natural mas são relativamente fáceis de criar em grandes quantidades e são facilmente aceites pelas larvas. Por outro lado, a cultura destes constituintes do zooplâncton requer um investimento considerável em infra-estruturas (tanques, água e bombas de água, tratamento de água) bem como em energia e mão-de-

obra. Além disso, o alimento vivo não pode ser armazenado ou é deficiente em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa específicos (PUFA), tais como ácido docosahexaenóico e ácido eicosapentaenóico (EPA) os quais são necessários na dieta para o crescimento rápido das larvas que podem apresentar uma taxa de crescimento diária relativa (RGR) de 25-50% (Koven, W., Tandler, A., Kissil, G. Wm., Sklan, D. 1992 "The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval Sparus aurata and their effect on survival, lipid composition and size distribution". Aquaculture 104; 91-104). Isto também é verdade com ácido araquidónico (ArA) que foi recentemente reconhecido como desempenhando um papel central no aumento da resistência ao stress (Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia. I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A. 2001 "The effect of arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (Sparus aurata) larvae". Aquaculture 193, 107-122). Consequentemente, os rotíferos e Artemia devem ser enriquecidos com estes PUPA, alimentando-os com preparações comerciais de DHA e EPA, antes de os oferecer às larvas do peixe.

Os sistemas de cultura de alimento vivo são frequentemente flagelados por um fornecimento inconsistente de constituintes de zooplâncton que têm um teor nutricional variável e são susceptíveis a quebras repentinas de população. Assim por exemplo uma interrupção no fornecimento e/ou uma inconsistência na qualidade alimentar

do alimento dado às larvas pode reduzir severamente a sua taxa de crescimento, estendendo o tempo de residência no viveiro ou resultando na transferência de larvas menos robustas, mais pequenas para o viveiro, resultando em crescimento e sobrevivência reduzida. Além disso, alimentação pobre causa stress, resultando numa resistência diminuída à doença. Em anos recentes, primariamente devido a exploração excessiva, houve um declínio rápido na disponibilidade, a nível mundial, de cistos de *Artemia* resultando na flutuação de preços e qualidade reduzida dos cistos combinando os problemas de providenciar estes constituintes do zooplâncton. Uma vantagem clara de usar nemátodos como alimento é que os nemátodos podem ser armazenados num estado adormecido-desidratado, após enriquecimento. Eles podem ser encapsulados e reavivados num estágio posterior para alimentar as larvas. Esta conveniência "off-the-shelf" providencia um fornecimento alimentar nutricionalmente consistente e confiável às larvas, que pode ser providenciado com menos investimento do que outras espécies convencionais de alimento vivo.

Os ácidos gordos essenciais para as larvas marinhas tais como ácido docosahexaenóico (22:6n-3), ácido eicosapentaenóico (20:5n-3) e ácido araquidónico (20:4n-6) pode ser providenciado aos nemátodos através de várias emulsões oleosas. Estudos prévios mostraram que os nemátodos filtram facilmente as micelas das emulsões oleosas. Estudos recentes mostraram que o uso de lipossomas para alimentar nemátodos é uma abordagem promissora para

alargar o leque de aditivos alimentares que podem ser usados no enriquecimento. Os lipossomas são pequenas vesículas lipídicas (0,025-1 $\mu$ m) consistindo de um volume aquoso rodeado por uma membrana bi-lamelar de fosfolípidos. É relativamente fácil incorporar vitaminas, minerais, proteínas e aminoácidos solúveis em água no volume aquoso e/ou nutrientes lipossolúveis tais como lípidos, vitaminas e pigmentos na membrana de fosfolípidos do lipossoma (Koven, W., Barr, Y., Hadas, E., Benatia, I., Chen, Y., Weiss, R., Tandler, A. 1999. "The potential of liposomes as a nutrient supplement in first-feeding marine fish larvae". *Aquaculture Nutrition* 5, 251-256).

Um estudo recente mostrou que os lipossomas podem ser usados para enriquecer náuplios de *Artemia* com o aminoácido livre metionina (Tonheim, S.K., Koven, B, Rinnestad, I 2000. "Enrichment of *Artemia* with free methionine" *Aquaculture* 190, 223-235). Este constituinte do zooplâncton é geralmente deficiente neste aminoácido e o seu enriquecimento pode contribuir para síntese proteica mais eficiente. Esta abordagem foi recentemente expandida para incluir o enriquecimento de nemátodos com este e outros aminoácidos livres bem como ácidos gordos livres, que estimulam hormonas digestivas nas larvas tal como colecistoquinina (CCK). CCK é um factor principal na libertação de enzimas pancreáticas resultando numa intensificação da digestão e assimilação de nutrientes dietéticos. Além disso, os lipossomas dados aos nemátodos, contendo imunoestimulantes, vacinas e outros fármacos podem

estimular a resistência à doença e ao stress nas larvas resultando numa qualidade melhorada de larvas e peixe juvenil.

A Patente EUA N° 5183950 de Popiel et al ensina um método para armazenamento e remessa comercial de nemátodos entomógenos (parasitas a insectos). Relaciona-se com métodos de desidratar, embalar, armazenar, e embarcar nemátodos parasitas de insectos em quantidades pequenas e grandes enquanto se mantém a sua viabilidade e patogenicidade para insectos. O método de Popiel não menciona enriquecimento dos nemátodos antes do armazenamento.

A Patente EUA N° 5042427 de Bedding descreve um método de armazenar e transportar nemátodos enteropatogénicos usando argila para secar os nemátodos, os quais são reavivados quando dispersos em água. O método de Bedding não menciona o enriquecimento dos nemátodos antes do armazenamento.

A desidratação dos nemátodos é também ensinada por Solomon et al. (Solomon A., Papema I., Glazer I. 1999 "Desiccation survival of the entomopathogenic nematode *Steinemema feltiae*: induction of anhydrobiosis" *Nematology* 1 (1), 61-68) bem como por Perry (Perry R. 1999 "Desiccation survival of parasitic nematodes". *Parasitology* 119, S19-S30). Aqui novamente não existe menção ao enriquecimento de nemátodos antes da desidratação.

WVO Pat. N° 95/18527 da "Agricultural Genetics Company LTD" ensina o enriquecimento de nemátodos com vários aditivos tais como vários óleos e pigmentos para usar como alimento vivo de larvas. Este método ilustra as vantagens de dar nemátodos enriquecidos para alimentar larvas mas não existe menção a armazenamento a longo prazo de nemátodos.

O nemátodo de vida livre *Caercohabditis elegans* (*C. elegans*) tem sido usado como organismo genético modelo e tem sido objecto de análise genética e molecular intensiva (Jorgensem EM., e Mango SE. 2002 "The art and design of genetics screens: *Caenorhabditis elegans*." Nature Reviews Genetics 3: 356-369; The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1988 "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." Science 282: 2012-2018; Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., e Priess, JR. "C. elegantII". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, 1997). Não houve, contudo, nenhuma menção ao enriquecimento, conservação ou armazenamento de *C. elegans* para uso "off-the-shelf" em aquacultura.

Existe assim uma necessidade amplamente reconhecida para, e seria altamente vantajoso ter, um processo para conservar e armazenar nemátodos tendo um valor alimentar acrescentado desprovido das limitações acima.

SUMÁRIO DO INVENTO

De acordo com um aspecto do presente invento é providenciado um método melhorado de aquacultura. O método compreende os passos de:

(a) enriquecer os nemátodos de vida livre com aditivos alimentares de aquacultura.

(b) desidratar os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos;

(c) armazenar os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos desidratados;

(d) re-hidratar e reavivar os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos desidratados; e

(e) alimentar um organismo a ser criado em aquacultura com os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos re-hidratados reavivados, em que o passo de crescimento é efectuado alimentando os ditos nemátodos com lipossomas contendo aditivos de enriquecimento.

De acordo com outro aspecto do presente invento é providenciado um método melhorado de aquacultura. O método compreende os passos de:

(a) desidratar os nemátodos de vida livre;

(b) armazenar os ditos nemátodos de vida livre desidratados;

(c) re-hidratar e reavivar os ditos nemátodos de vida livre desidratados;

(d) enriquecer os ditos nemátodos de vida livre re-hidratados reavivados com aditivos alimentares; e

(e) alimentar um organismo a ser criado em aquacultura com os ditos nemátodos de vida livre re-hidratados reavivados enriquecidos, em que o passo de enriquecimento é efectuado alimentando os ditos nemátodos com lipossomas contendo aditivos de enriquecimento.

Num modelo de realização preferido dos métodos de aquacultura de acordo com o invento, o passo de enriquecer os nemátodos inclui manipulação genética do nemátodo.

De acordo com características adicionais nos modelos de realização preferidos do invento descrito abaixo, o processo compreende ainda o passo de cultivar nemátodos.

Ainda de acordo com características adicionais nos modelos de realização preferidos descritos, o nemátodo de vida livre é da espécie *Panagrellus*.

Ainda de acordo com características adicionais nos modelos de realização preferidos descritos, o nemátodo de vida livre é da espécie *Caenorhabditis elegans*.

Ainda de acordo com características adicionais nos modelos de realização preferidos descritos, o passo de enriquecer nemátodos inclui providenciar pelo menos um aditivo de enriquecimento seleccionado a partir do grupo consistindo de ácidos gordos essenciais, vacinas, hormonas, imunoestimulantes, iscos, nutrientes e pigmentos.

Ainda de acordo com características adicionais nos modelos de realização preferidos descritos, o passo de desidratar os nemátodos é realizado induzindo um item seleccionado do grupo consistindo de anidrobiose e osmobiose quiescentes.

Ainda de acordo com características adicionais nos modelos de realização preferidos descritos, o passo de enriquecimento dos nemátodos inclui manipulação genética de nemátodos.

Ainda de acordo com características adicionais nos modelos de realização preferidos descritos, o passo de conservar os nemátodos inclui reduzir de forma significativa o metabolismo dos nemátodos baixando a temperatura dos nemátodos.

Dentre as vantagens do lado prático da "off-the-shelf" têm-se:

a) a capacidade de armazenar nemátodos enriquecidos assegura um fornecimento constante de alimento às larvas. Devido á rápida taxa de crescimento diário das larvas (RGR de 25-50%), a interrupção do fornecimento de alimento, como resultado de falha no equipamento, quebra nas culturas de algas e rotíferos e taxas de incubação mais baixas dos cistos de Artemia de baixa qualidade, pode traduzir-se em crescimento e sobrevivência larvar menos do que óptimo.

b) visto que os lotes de nemátodos enriquecidos podem ser testados para o teor de nutrientes antes do armazenamento, pode ser assegurada uma qualidade nutricional consistente antes de alimentar as larvas.

c) a capacidade para produzir um produto para armazenamento, significa que podem ser construídas reservas suficientes. Isto é vantajoso senão será necessário investimento adicional em infra-estrutura, trabalho e energia quando comparado com qualquer outro método tradicional de abastecimento alimentar.

d) a capacidade de armazenar nemátodos enriquecidos é uma base para um produto comercial que poderia competir com cistos de Artemia, que é um recurso flagelado por abastecimento diminuído, qualidade variável, contamina-

ção ocasional com pesticidas flutuando a preços elevados, e é uma recurso não sustentável.

e) a composição corporal dos Artemia recém-nascidos reflecte apenas processos naturais no ambiente no qual os reprodutores de Artemia habitaram. A eclosão de cistos, sendo um processo natural, NÃO garante controle sobre a qualidade dos náuplios recém-nascidos, em termos de composição corporal. Por outro lado, os nemátodos que se dirigem a larvas do mesmo tamanho, podem ser enriquecidos antes da sua encapsulação para armazenamento a longo prazo.

O presente invento dirige-se com sucesso às limitações das configurações presentemente conhecidas providenciando um processo para conservar e armazenar nemátodos tendo um valor nutricional acrescido para uso posterior na alimentação de organismos de aquacultura.

#### BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO

O invento é aqui descrito, apenas a título de exemplo, com referência aos desenhos que o acompanham. Referindo agora especificamente o desenho em detalhe, sublinha-se que os particulares mostrados são-no a título de exemplo e apenas com o propósito de discussão ilustrativa dos modelos de realização preferidos do presente invento, e são apresentados para providenciar o que se acredita ser a descrição mais útil e mais facilmente compreendida, dos princípios e aspectos conceptuais do

invento. Neste aspecto, não é feita nenhuma tentativa de mostrar detalhes estruturais do invento em mais detalhe do que o necessário para a compreensão fundamental do invento, tornando-se a descrição feita com o desenho aparente para os especialistas na arte de como as várias formas do invento podem ser realizadas na prática:

No desenho:

FIG 1 é um diagrama de fluxo de um método melhorado de aquacultura.

#### DESCRIÇÃO DOS MODELOS DE REALIZAÇÃO PREFERIDOS

O presente invento é um método de aquacultura, que pode ser usado para alimentar larvas. Especificamente, o presente invento pode ser usado para conservar e armazenar nemátodos enriquecidos desidratados de modo a poderem ser retirados "off the shelf", serem re-hidratados e reavivados para usar como necessário. Este método omite a necessidade de alimento vivo para aquacultura tal como *Artemia*, rotíferos, copépodos, etc.

Os princípios e operação de um método de aquacultura, de acordo com o presente invento, podem ser melhor compreendidos com referência ao desenho e descrições que o acompanham.

Antes de explicar pelo menos um modelo de reali-

zação do invento em detalhe, é para ser compreendido que o invento não está limitado na sua aplicação aos detalhes de construção e à combinação dos componentes expostos na descrição seguinte ou ilustrados no desenho. O invento é capaz de outros modelos de realização ou de ser praticado ou levado a cabo de vários modos. É também para ser compreendido que a fraseologia e terminologia utilizadas são para o propósito descritivo deste invento e não devem ser olhadas como limitantes.

Para os propósitos desta especificação e reivindicações que a acompanham, o termo "nemátodos" refere-se a todos os tipos de nemátodos. Embora os métodos do presente invento sejam praticáveis com todos os nemátodos, eles são de preferência praticados com nemátodos de vida livre (i.e. não parasitas), com mais preferência com as espécies *Panagrellus* bem como *C. elegans*.

Para os propósitos da especificação e reivindicações que a acompanham, o termo "desidratação" refere-se a remoção da água de um organismo por evaporação, por pressão osmótica ou por qualquer outro meio que sirva este propósito.

Para os propósitos da especificação e reivindicações que a acompanham, o termo "aquacultura" refere-se à criação e propagação de qualquer organismo aquático.

Para os propósitos da especificação e reivindi-

cações que a acompanham, o termo "enriquecer" refere-se a substâncias providenciadas aos nemátodos via a sua dieta, meio ou de outro modo, para aumentar o nível da substância respectiva no corpo do nemátodo antes de o dar como alimento ao organismo alvo e pode incluir mas não é restritivo a ácidos gordos essenciais, vacinas, hormonas, imunoes-timulantes, iscos, nutrientes ou pigmentos.

Referindo agora o desenho, a Figura 1 é um diagrama de fluxo ilustrando o método **10** para conservação de nemátodos tendo um valor alimentar acrescentado. O método **10** inclui o passo de criar nemátodos **12**. A cultura de nemátodos é conhecida dos especialistas na arte de nematologia. Os nemátodos podem ser alimentados com leveduras e bactérias que actuam como mediadores para a distribuição de alimento aos nemátodos. Alternativamente, ou adicionalmente os nemátodos podem ser postos a crescer numa escala industrial com o uso de fermentadores.

De acordo com o método **10** do presente invento, os nemátodos são "enriquecidos" com aditivos alimentares de aquacultura **14** imediatamente antes ou alternadamente após colheita. Os nemátodos são enriquecidos com pelo menos um aditivo tal como ácidos gordos essenciais, vacinas, hormonas, imunoes-timulantes, iscos, nutrientes ou pigmen-tos, que são adicionados ao alimento dos nemátodos. Um mediador que foi usado com sucesso para dar os aditivos aos nemátodos é o da introdução dos aditivos em lipossomas e depois alimentar os nemátodos com os lipossomas. Os ácidos

gordos essenciais para as larvas marinhas tais como ácido docosahexaenóico (22:6n-3), ácido eicosapentaenóico (20:5n-3) e ácido araquidónico (20:4n-6) podem ser providenciados aos nemátodos através de várias emulsões oleosas. Além disso, os lipossomas contendo imunoestimulantes e vacinas, podem ser dados aos nemátodos, os quais podem melhorar a resistência à doença nas larvas que se alimentam deles. Além disso, os nemátodos podem ser alimentados por lipossomas contendo ácidos amino (FAA) e gordos (FFA) livres específicos que estimulam as hormonas digestivas nas larvas tal como colecistoquinina (CCK). CCK é um factor principal na libertação de enzimas pancreáticas resultando na melhoria da digestão e assimilação de nutrientes dietéticos. Outros FAA podem ser incorporados nos lipossomas para estimular o apetite ou para melhorar a síntese proteica nas larvas dando uma composição em aminoácidos mais equilibrada.

Em modelos de realização preferidos alternativos, o enriquecimento dos nemátodos com aditivos alimentares de aquacultura **(14)** inclui uma abordagem diferente. Nestes modelos de realização preferidos, o enriquecimento é conseguido por manipulação genética do genoma do nemátodo. Tal abordagem é mais facilitada usando um nemátodo tal como o nemátodo bem estudado *C. elegans*. O genoma do *C. elegans* foi completamente sequenciado (The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998 "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology". Science 282: 2012-2018). Usando técnicas padrão de biologia

molecular vários genes e sequências de genes no *C. elegans* podem ser manipulados (incluindo os genes estruturais e reguladores) para aumentar a expressão de vários compostos nutrientes e componentes intrínsecos das espécies. Alternativamente podem ser introduzidas novas sequências genéticas no genoma do nemátodo para enriquecer o teor nutricional do nemátodo ou para produzir outros compostos do tipo biofármaco, incluindo, mas não limitados a ácidos gordos essenciais, vacinas, hormonas, factores de crescimento, imunoestimulantes, iscos, nutrientes ou pigmentos.

A introdução de material genético pode utilizar várias técnicas para a produção de nemátodos transgênicos incluindo, como exemplos não limitantes, mutagénese de alvo seleccionado e manipulação e mobilização de elementos transponíveis conhecidos (e.g., Tc1) bem como várias técnicas padrão para introdução genética no *C. elegans* incluindo microinjecção (Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., e Priess, J.R. "C. elegans II". Cold Spring Harbor Laboratory Press Nova Iorque 1997).

Linhas transgênicas de *C. elegans* são geradas por transformação de *C. elegans* com DNA exógeno por microinjecção de vectores transportando sequências de DNA para os ovários sinciciais de hermafroditas adultos. O DNA injectado forma "tandem arrays" multimerizados de DNA microinjectado transportados como "arrays" extra-cromossomais semi-estáveis, ou integrados num cromossoma hospedeiro, formando uma linha transgênica integrada estável.

Incluindo marcadores genéticos apropriados com o DNA injectado, podem identificar-se os animais que transportam o transgene. Por vezes pode ocorrer a integração cromossomal do DNA introduzido, ou um "array" extra-cromossomal existente pode ser integrado após irradiação de uma linha transgênica. Ver Riddle D. L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., e Priess, JR. "C. elegans II". Cold Spring Harbor Laboratory Press Nova Iorque 1997; Hashmi, S., G. Hashmi & R. Gaugler. 1995. "Genetic Trnasformation of an entomopathogenic nematode by microinjection". J. Inverter. Pathol. 66:293-6; "Methods in Cell Biology Vol 48 Caenorabhditis elegans-"Modern Biological Analysis of an organism", Eds. Epstein e Shakes, Academic Press, 1995; Kwa MS., Veenstra, JG., Van Dijk, M., e Roos, MH. 1995 "Beta-tubulin genes from the parasitic nematode Haemonchus contottus modulate drug resistance in Caenorhabditis elegans." J. Mol. Biol. 246(4):500-10.; Fire, A. 1986. "Integrative transformation of Caenorhabditis elegans. EMBO J. 5: 2673-2689 por exemplo.

Após alimentar os nemátodos com o aditivo de enriquecimento, os nemátodos enriquecidos estão prontos para alimentar as larvas de criação ou são desidratados **16** para uso "off-the-shelf" futuro. Vários métodos anteriores de desidratação foram discutidos acima na introdução e são conhecidos dos especialistas em nematologia. Um método preferido de desidratação é realizado induzindo uma anidrobiose ou osmobiose quiescente. Anidrobiose/osmobiose ou desidratação dos nemátodos é optimamente uma anidrobiose

quiescente. Quiescência é uma resposta espontânea reversível a condições ambientais desfavoráveis e imprevisíveis e a saída da quiescência ocorre quando as condições favoráveis voltam. Os nemátodos enriquecidos e desidratados são então guardados **18** e estão disponíveis num estado desidratado para usar conforme necessário no futuro.

A desidratação **16** é uma alternativa a outras técnicas para conservar os nemátodos enriquecidos.

Por exemplo, após enriquecimento, os nemátodos enriquecidos podem ser conservados para uso "off-the-shelf" futuro baixando a temperatura dos nemátodos enriquecidos para parar ou reduzir de forma significativa o metabolismo dos nemátodos enriquecidos. Antes de usar, os nemátodos podem ser recuperados e reavivados elevando a temperatura dos nemátodos conservados para a temperatura normal.

A Fig 1 ilustra ainda um método melhorado de aquacultura. O método inclui o passo de criar nemátodos **12**. A cultura de nemátodos é conhecida dos especialistas na arte de nematologia. Os nemátodos podem ser alimentados com leveduras e bactérias actuando como mediadores para a distribuição de alimento aos nemátodos. Alternativamente, ou adicionalmente, os nemátodos podem ser criados numa escala industrial com o uso de fermentadores.

De acordo com o método **10** do presente invento, após um período de tempo, antes de colher ou alternada-

mente após colher, os nemátodos são enriquecidos com aditivos de aquacultura **14**. Um novo meio de incorporar aditivos alimentares nos nemátodos é o de usar um mediador. Um mediador que foi usado com sucesso para dar os aditivos alimentares aos nemátodos são lipossomas que contêm aditivos alimentares. Adicionalmente, podem ser utilizados outros mediadores para este propósito.

Após alimentar os nemátodos com o aditivo de enriquecimento, os nemátodos enriquecidos estão prontos a alimentar as larvas de criação ou a serem desidratados **16** para uso futuro. Vários métodos anteriores de desidratação foram discutidos na introdução e são conhecidos dos especialistas na arte de nematologia. Os nemátodos enriquecidos desidratados são então guardados **18** e estão disponíveis num estado desidratado para uso "off-the-shelf" numa data futura.

Antes de usar, os nemátodos enriquecidos desidratados são re-hidratados e reavivados **20**. A seguir à re-hidratação, os nemátodos enriquecidos re-hidratados são dados como alimento a um organismo a ser criado em aquacultura **22**.

Num modelo de realização alternativo do presente invento os nemátodos que foram criados são desidratados e depois armazenados. Antes de usar os nemátodos desidratados são re-hidratados e reavivados e depois os nemátodos são enriquecidos com aditivos alimentares e depois dados como

alimento a um organismo que está a ser criado em agricultura.

Em modelos de realização alternativos do presente invento preferidos, o enriquecimento de nemátodos com aditivos alimentares de aquacultura **(14)** antes da conservação inclui manipulação genética do genoma de nemátodos, como descrito aqui acima.

A conservação dos nemátodos enriquecidos pode incluir baixar a temperatura dos nemátodos enriquecido para parar ou reduzir de forma significativa o metabolismo dos nemátodos enriquecidos. Antes de usar, os nemátodos podem ser recuperados e reavivados elevando a temperatura dos nemátodos conservados até à temperatura normal, e depois dados como alimento a um organismo criado em aquacultura.

Geralmente a nomenclatura usada aqui e os procedimentos laboratoriais utilizados no presente invento incluem técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas, e DNA recombinante. Tais técnicas são explicadas detalhadamente na literatura. Ver, por exemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nova Iorque (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American

Books, Nova Iorque; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque (1998); metodologias como expostas nas Patentes EUA Nos. 4 666 828; 4 683 202; 4 801 531; 5 192 659 e 5 272 057; "Cell Biology: A laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Terceira edição; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) e "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); Riddle D. L., Blumenthal, T., Meyer, BJ., e Priess, JR. "C. elegans II". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, 1997; Hashmi, S., G. Hashmi & R. Gaugler. 1995. "Genetic Transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection". J. Invertebr. Pathol. 66: 293-6; Methods in Cell Biology Vol 48 Caenorabhditis elegans-Modern Biological analysis of an organism, eds Epstein e Shakes, Academic Press, 1995; Kwa MS., Veenstra, JG., Van Dijk, M., e Roos, MH. 1995 "Beta-tubulin genes from the parasitic nematode Haemonchus contortus modulate drug

resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 246(4): 500-10; Fire, A. 1986. "Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 5: 2673-2680; Jorgensen EM., e Mango SE. 2002 "The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*". *Nature Reviews Genetics* 3: 356-369; e The C. elegans Sequencing Consortium. 1998 "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018.

Outras referências gerais são providenciadas através deste documento. Acredita-se que os procedimentos são bem conhecidos na arte e são providenciados para conveniência do leitor.

Embora o invento tenha sido descrito em conjunção com modelos de realização específicos deste, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações serão aparentes para os especialistas na arte de nematologia. De acordo com isto, pretende-se englobar todas essas alternativas, modificações e variações que caiam no âmbito das reivindicações apensas.

Lisboa, 21 de Agosto de 2012

**REIVINDICAÇÕES**

1. Um método melhorado de aquacultura, compreendendo o método os passos de:

(a) enriquecer nemátodos de vida livre com aditivos alimentares de aquacultura;

(b) desidratar os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos;

(c) armazenar os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos desidratados;

(d) re-hidratar e reavivar os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos desidratados; e

(e) alimentar um organismo a ser criado em aquacultura com os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos re-hidratados reavivados, em que o passo de enriquecimento é efectuado alimentando os ditos nemátodos com lipossomas contendo aditivos de enriquecimento.

2. O processo da reivindicação 1, em que o dito passo de enriquecimento inclui manipulação genética do nemátodo.

3. Um método melhorado de aquacultura, compreendendo o método os passos de:

(a) desidratar os nemátodos de vida livre;

(b) armazenar os ditos nemátodos de vida livre desidratados;

(c) re-hidratar e reavivar ditos nemátodos de vida livre desidratados; e

(d) enriquecer os ditos nemátodos de vida livre re-hidratados reavivados com aditivos alimentares; e

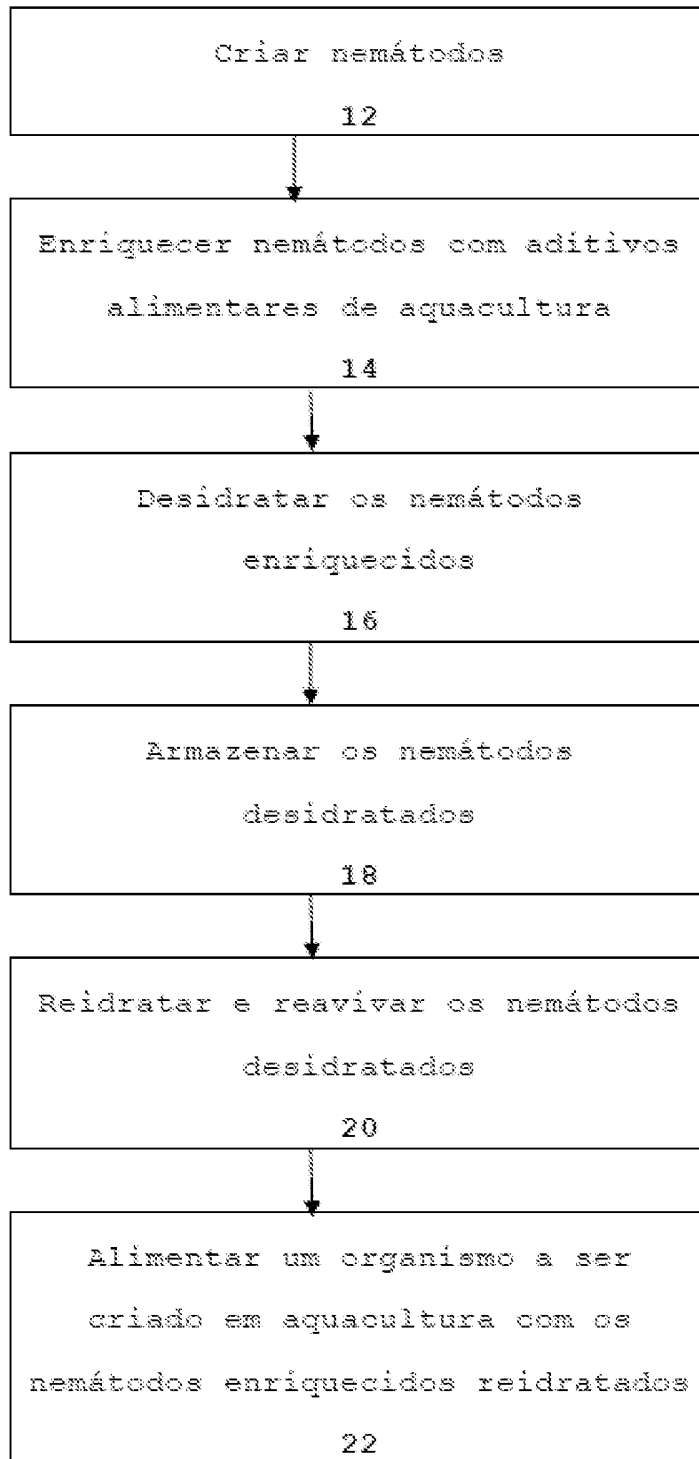
(e) alimentar um organismo a ser criado em aquacultura com os ditos nemátodos de vida livre enriquecidos re-hidratados reavivados, em que o passo de enriquecimento é efectuado alimentando os ditos nemátodos com lipossomas contendo aditivos de enriquecimento.

4. O processo da reivindicação 3, em que o dito passo de enriquecimento de nemátodos inclui manipulação genética de nemátodos.

Lisboa, 21 de Agosto de 2012

**Fig. 1**

10



## REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

### Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 5183950 A, Popiel
- US 5042427 A, Bedding
- WO 8518527 A
- US 4666828 A
- US 4683202 A
- US 4801531 A
- US 5192659 A
- US 5272057 A

### Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- KOVEN, W. ; TANDLER, A. ; KISSIL, G.W.M. ; SK-LAN, D. The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture*, 1992, vol. 104, 91-104
- KOVEN, W. ; BARR, Y. ; LUTZKY, S. ; BEN-ATIA, I. ; WEISS, R. ; HAREL, M. ; BEHRENS, P. ; TANDLER, A. The effect of arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 2001, vol. 193, 107-122
- KOVEN, W. ; BARR, Y. ; HADAS, E. ; BEN-ATIA, I. ; CHEN, Y. ; WEISS, R. ; TANDLER, A. The potential of liposomes as a nutrient supplement in first-feeding marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 1999, vol. 5, 251-258
- TONHEIM, S.K. ; KOVEN, B. ; RINNESTAD, I. Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture*, 2000, vol. 190, 223-235
- SOLOMON A. ; PAPEMA I. ; GLAZER I. Desiccation survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*: induction of anhydrobiosis. *Nematology*, 1999, vol. 1 (1), 61-68
- PERRY R. Desiccation survival of parasitic nematodes. *Parasitology*, 1999, vol. 119, S19-S30
- JORGENSENEM. ; MANGO SE. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics*, 2002, vol. 3, 356-369
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998 Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. RIDDLE D.L. ; BLUMENTHAL, T. ; MEYER, B.J. ; PRIESS, JR. ; C. ELEMENTAL II. Science. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, vol. 282, 2012-2018
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998 Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 1998, vol. 282, 2012-2018
- RIDDLE D.L. ; BLUMENTHAL, T. ; MEYER, B.J. ; PRIESS, JR. *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997
- HASHMI, S. ; G. HASHMI ; R. GAUGLER. Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. *J. Invertebr. Pathol.*, 1995, vol. 66, 293-8
- Methods in Cell Biology Vol 48 *Caenorhabditis elegans*. Modern Biological analysis of an organism. Academic Press, 1995, vol. 48
- KWA MS. ; VEENSTRA, JG. ; VAN DIJK, M. ; ROOS, MH. Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*, 1995, vol. 248 (4), 500-10
- FIRE, A. integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*, 1988, vol. 5, 2673-2680
- SAMBROOK et al. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 1989
- Current Protocols in Molecular Biology. 1994, vol. I-III
- AUSUBEL et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 1989
- PERBAL. A Practical Guide to Molecular Cloning. John Wiley & Sons, 1988
- WATSON et al. Recombinant DNA. Scientific American Books
- Genome Analysis: A Laboratory Manual Series. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, vol. 1-4
- Cell Biology: A Laboratory Handbook. 1994, vol. I-III
- FRESHNEY. Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique. Wiley-Liss, 1994
- Oligonucleotide Synthesis. 1984
- Nucleic Acid Hybridization. 1985
- Transcription and Translation. 1984
- Animal Cell Culture. 1986
- Immobilized Cells and Enzymes. IRL Press, 1986
- PERBAL, B. A Practical Guide to Molecular Cloning. 1984

- *Methods in Enzymology*. Academic Press, vol. 1-317
- *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*. Academic Press, 1990
- **MARSHAK et al.** *Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual*. CSHL Press, 1996
- **HASHMI, S. ; G. HASHMI ; R. GAUGLER.** Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. *J. Invertebr. Pathol.*, 1995, vol. 66, 293-6
- *Methods in Cell Biology Vol 48 Caenorabditis elegans. Modern Biological analysis of an organism*. Academic Press, 1995
- **JORGENSENEM. ; MANGO SE.** The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics*, 2002, vol. 3, 358-369
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998 Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, vol. 282, 2012-2016