

4

BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA

FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

colaboradores

CARLOS RICARDO SOCCOL
LUIZ RENATO DE FRANÇA

organizador

RODRIGO RIBEIRO RESENDE

Blucher

 **CNPq**
Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico

BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA

Blucher



MATERIAL DE APOIO
www.blucher.com.br

BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA

FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

VOLUME 4

RODRIGO RIBEIRO RESENDE

ORGANIZADOR

CARLOS RICARDO SOCCOL

LUIZ RENATO DE FRANÇA

COLABORADORES

Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações — vol. 4
(coleção Biotecnologia Aplicada à Saúde, vol. 4)

© 2016 Rodrigo Ribeiro Resende (organizador)
Editora Edgard Blücher Ltda.

Blucher

Rua Pedrosa Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934, São Paulo — SP — Brasil
Tel.: 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo o Novo Acordo Ortográfico, conforme 5ª ed.
do *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*,
Academia Brasileira de Letras, março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer
meios, sem autorização escrita da editora.

Todos os direitos reservados pela Editora Edgard Blücher Ltda.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Angélica Ilacqua CRB-8/7057

Biotechnology applied to agro&industry : fundamentals and applications
- volume 4 [livro eletrônico] / organizado por Rodrigo Ribeiro
Resende ; colaboração de Carlos Ricardo Soccol e Luiz Renato de
França. — São Paulo : Blucher, 2016.
1069 p. : il. ; PDF.

Bibliografia
ISBN 978-85-212-1115-0 (e-book)
ISBN 978-85-212-1114-3 (impresso)

1. Biotecnologia. 2. Agroindústria. 3. Fármacos e Medicamentos.
4. RNA. I. Resende, Rodrigo Ribeiro. II. Soccol, Carlos Ricardo.

16-1093

CDD 620.8

Índices para catálogo sistemático:
1. Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

Esta obra não poderia ter sido iniciada sem a dedicação de cada um dos que participaram de sua elaboração, desde os professores, alunos, editores, revisores, diagramadores, financiadores, amigos, esposa, irmão, pais, leitores até o desejo de tornar o conhecimento acessível para todos. Obrigado!

Prof. Rodrigo R. Resende

APOIO



**NANOCELL
NEWS**

O jornal eletrônico do Instituto
NANOCELL
ISSN 2318-5880
DOI 10.15729
www.institutonanozell.org.br
www.facebook.com/InstitutoNanocell



FAPEMIG

Agradecemos pelo apoio financeiro aos projetos científicos da Fapemig, CNPq, Capes, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanomateriais de Carbono, Rede Mineira de Toxinas com Ação Terapêutica e Instituto Nanocell.

CARTA AO LEITOR

A corrupção é o verdadeiro genocídio de uma sociedade, e o único meio de combatê-la é o conhecimento. O conhecimento, adquirido pelo povo por meio da educação, transformado, multiplicado e compartilhado, constrói uma verdadeira nação. Nação esta cujos cidadãos honram, reconhecem e proclamam sua pátria e seu povo, para todos, em todo lugar, para todo o sempre.

Podemos ser pressionados de todos os lados, mas não desanimados; podemos ficar perplexos, mas não desesperados; somos perseguidos, mas não abandonados; abatidos, mas não destruídos.

Embora exteriormente estejamos nos desgastando, interiormente somos renovados dia após dia, pois nossos sofrimentos leves e momentâneos produzem para nós uma glória eterna que pesa mais do que todos eles. Assim, fixamos os olhos não naquilo que se vê, mas na glória eterna que se há de ter.

Mesmo que esta carta tenha lhe causado tristeza ou estranheza, não me arrependo. É possível que o tenha entristecido, ainda que por pouco tempo. Agora, porém, me alegro, não porque você foi entristecido, mas porque a tristeza o levou ao arrependimento.

A tristeza segundo o amor produz um arrependimento que leva à salvação e não ao remorso, mas a tristeza segundo a mentira produz morte. A tristeza segundo o perdão produz dedicação, desculpas, indignação, temor, saudade, preocupação, desejo de ver a justiça feita! Assim, se lhe escrevi, não foi por causa daquele que cometeu o erro nem daquele que foi prejudicado, mas para que diante do Supremo você pudesse ver por si próprio como é a formação da natureza humana.

Prof. Rodrigo R. Resende

Presidente da Sociedade Brasileira de Sinalização Celular
Presidente Fundador do Instituto Nanocell

CONTEÚDO

| | |
|---|-----|
| <i>Prefácio – Maurício Antônio Lopes (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa)</i> | 11 |
| Novos fármacos – Quimiometria e modelagem molecular | |
| 1. Metabolômica e quimiometria como ferramentas para análises quimio(bio) diversas | 17 |
| 2. Identificação de substâncias puras ou em formulações através de análise espectral e quimiometria | 51 |
| 3. Simulação computacional de reações enzimáticas e suas aplicações em biotecnologia | 103 |
| 4. Processos de bioconversão aplicados à obtenção de fármacos e intermediários | 137 |
| Síntese de peptídeos | |
| 5. Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo | 175 |
| 6. Produção de peptídeos: aprimoramento da síntese em polímeros através do uso da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) | 197 |
| Produção de bioaditivos | |
| 7. Bioprocessos na produção de aditivos alimentares | 249 |
| 8. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial | 283 |
| 9. Cogumelos: uma fonte promissora de compostos ativos para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e nutracêuticos | 315 |
| 10. Da planta ao medicamento: caso de estudo das proteinases de Caricaceae com atividade farmacológica | 361 |
| Caracterização de proteínas e aplicações na indústria | |
| 11. Peptidases em biotecnologia: produção, aplicações e mercado | 381 |
| 12. RMN no domínio do tempo: fundamentos e aplicações <i>offline</i> e <i>inline</i> | 439 |
| 13. Produção de biolubrificantes catalisada por lipases: fundamentos e aplicações | 471 |
| 14. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e em alimentos | 503 |
| 15. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte | 529 |
| 16. Produção de enzimas oxidativas em substratos lignocelulósicos e aplicação na deslignificação de polpas celulósicas | 569 |

Genética para melhoramento de plantas

| | |
|---|-----|
| 17. Regulação genética e epigenética de respostas ao estresse em populações naturais de plantas | 603 |
| 18. Plantas transgênicas: fundamentos, métodos de produção e aplicações | 649 |
| 19. Pequenos RNAs e aplicações de RNAi em plantas | 675 |
| 20. Enfoque biotecnológico para o controle de vírus de plantas | 709 |

Aplicações diversas para a indústria

| | |
|--|------|
| 21. Toxinas inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 737 |
| 22. Suplementos nutricionais, hormônios e o controle da dopagem no esporte | 775 |
| 23. Princípios fundamentais dos <i>lasers</i> e suas aplicações | 815 |
| 24. Métodos imunológicos para a detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos, alimentos e rações | 895 |
| 25. Desafios da extração do RNA do vírus da dengue (ligação e extração ao DNA: métodos, aplicações e limitações) | 937 |
| 26. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas | 967 |
| 27. Gestão estratégica em ciência, tecnologia e inovação | 1013 |

| | |
|-------------------------|------|
| <i>Sobre os autores</i> | 1049 |
|-------------------------|------|

| | |
|------------------------|------|
| <i>Sobre a coleção</i> | 1069 |
|------------------------|------|

PREFÁCIO

A biotecnologia moderna tem gerado um conjunto amplo de conhecimentos envolvendo a utilização, a alteração controlada e a otimização de organismos vivos ou de suas estruturas, células e moléculas para a geração de produtos, processos e serviços inovadores. Seus resultados são aplicáveis a diversos setores econômicos, como a saúde, a agroindústria e o meio ambiente, e envolvem várias áreas do conhecimento, como a biologia, a genética, a fisiologia, a microbiologia, a química e a tecnologia da informação, dentre muitas outras.

O cenário para a biotecnologia no Brasil é extremamente promissor, e o progresso nessa área poderá ser acelerado a partir de esforços conjugados entre o governo e as comunidades científica e empresarial no desenvolvimento de projetos conjuntos, na formação de parcerias produtivas, na criação de um ambiente favorável a novos investimentos para o desenvolvimento e/ou a adaptação de conhecimentos e tecnologias de base biológica. Tal avanço da área poderá promover revoluções no tratamento de doenças, na geração de medicamentos de aplicação humana e animal, no desenvolvimento e na melhoria de alimentos, na utilização sustentável da biodiversidade, na recuperação e no tratamento de resíduos, na multiplicação e na reprodução de espécies vegetais, animais e microbianas, e em muitas outras questões.

O crescimento e a expansão da base de inovação biotecnológica estão associados a dois componentes básicos e complementares: a excelência na área de pesquisa científica e a competitividade na abordagem tecnológica. É importante fortalecer a estratégia brasileira nessas duas frentes neste momento em que ganha força a bioeconomia, ramo da atividade humana que promete reunir todos os setores que utilizam recursos biológicos (seres vivos) para oferecer soluções coerentes, eficazes e concretas a grandes desafios, como as mudanças climáticas, a substituição de recursos fósseis, a segurança alimentar e a saúde da população.

Na verdade, a bioeconomia ganha força e visibilidade porque a sustentabilidade entrou de vez na agenda da sociedade. O futuro exigirá ênfase na produção de base biológica, com produtos seguros e renováveis e processos limpos e de baixo impacto ambiental. Na essência da bioeconomia está a pesquisa em vários ramos das biociências, com destaque para a biotecnologia, que o fundador da Microsoft, Bill Gates, descreveu certa feita como o campo do conhecimento humano que desempenha no presente o mesmo

papel exercido pela programação de computadores no século XX. O executivo bem-sucedido e principal filantropo da atualidade argumenta que “se alguém quer mudar o mundo de forma radical, deve começar pelas moléculas. Elas precisam do mesmo tipo de fanatismo amalucado, característico dos jovens gênios que criaram a indústria dos PCs”.

A natureza diferenciada da biotecnologia moderna, que se sustenta em processos amplamente disseminados na natureza e bastante genéricos do ponto de vista de aplicação, abre a possibilidade de um modelo de mercado de tecnologias mais inclusivo e diversificado. Modelo este que tomará o lugar do mercado de inovação até então conhecido, no qual a tecnologia é concentrada em um pequeno número de países, com domínio de um limitado número de processos e produtos. A evolução e as transformações nos vastos campos científico e de aplicações da moderna biotecnologia se processam em velocidade vertiginosa, e não há tempo a perder.

Não há tempo a perder, porque verdadeiras revoluções estão acontecendo nas biociências, com mudanças que nos permitem ampliar a compreensão de mecanismos complexos em plantas, animais e micro-organismos. Por causa disso, as indústrias alimentar, farmacêutica, química, da saúde, da energia e da informação estão se agregando de forma nunca antes imaginada. As fronteiras entre negócios tradicionalmente distintos já desapareceram, criando uma grande convergência na direção do que promete ser a maior indústria do planeta – a bioindústria. O Brasil tem experiência, capacidade e diversidade biológica inigualável para se destacar na nascente bioeconomia. A infraestrutura de pesquisa e inovação, o ambiente regulatório, os investimentos privados e o incentivo público precisam ser estimulados para que o país alcance o papel de destaque que lhe cabe.

Por outro lado, o impacto do homem nos sistemas biológicos, em diversos níveis (do microscópico ao global), aumenta à medida que o nosso conhecimento acerca dos sistemas vivos evolui. Estas duas tendências – aumento do conhecimento e da capacidade técnica e aumento da escala do impacto humano – criam uma série de interseções e incertezas, oportunidades e riscos relacionados a sistemas biológicos e ao futuro da biotecnologia e da bioeconomia. É fundamental investirmos na ampliação das nossas capacidades analítica e crítica, para examinarmos as complexas interseções de forças aqui envolvidas – biológicas, econômicas, políticas e culturais – e buscarmos antever e compreender cenários plausíveis para o desenvolvimento da biotecnologia, da bioindústria e da bioeconomia no Brasil.

Nesse contexto, um importante desafio é o acompanhamento da evolução do conhecimento na área biotecnológica, que se processa de forma

muito rápida, às vezes até alucinante. O processo rápido de convergência das ciências, que torna cada vez mais difusas as divisas tradicionais entre a biologia, a química, a física, a tecnologia da informação e outras vertentes do conhecimento, gera uma impressionante diversidade de técnicas e métodos, cobrindo avanços em tecnologias e métodos como DNA e proteínas recombinantes, microscopia, modelagem molecular, bionanotecnologia e bioinformática, e passando também por terapia gênica e geração de plantas e animais transgênicos.

A presente obra contribui de forma singular para a ampliação do entendimento do estado da arte das técnicas e dos métodos aplicáveis a diversas vertentes da biotecnologia moderna. Com os três primeiros volumes *Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações* e ainda o presente volume *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e Aplicações*, ganhamos obras didáticas que sintetizam os avanços mais relevantes em duas vertentes importantes da biotecnologia moderna: a saúde e a agroindústria. Ao todo, 362 colaboradores participaram deste projeto, todos professores e cientistas reconhecidos nacional e internacionalmente. O conteúdo reflete as visões, contribuições e análises oriundas de 78 laboratórios de pesquisa, envolvendo mais de 150 programas de pós-graduação do país, 49 departamentos de 39 universidades, mais 27 institutos de pesquisas distintos.

É importante ressaltar que praticamente todos os principais protagonistas da pesquisa biotecnológica do Brasil contribuíram para esta obra. Pela amplitude, atualidade e densidade do seu conteúdo, não tenho dúvidas sobre o seu potencial de impacto para os ensinos de graduação e pós-graduação no Brasil. O conteúdo de cada tópico aborda aspectos históricos, a evolução e o aprimoramento das técnicas e modelos apresentados, desde as possibilidades de uso terapêutico e/ou industriais no presente, até as perspectivas de evolução e de uso do conhecimento apresentado. Ele será de extrema utilidade para o treinamento da futura geração de cientistas, que terá a grande responsabilidade de bem posicionar o Brasil na nascente bioeconomia, já que do contrário andarás em retrocesso ao mundo desenvolvido. Eu parabeno os editores e colaboradores que tornaram realidade esta importante obra!

Maurício Antônio Lopes

Presidente

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

NOVOS FÁRMACOS – QUIMIOMETRIA E MODELAGEM MOLECULAR

METABOLÔMICA E QUIMIOMETRIA COMO FERRAMENTAS PARA ANÁLISES QUIMIO(BIO) DIVERSAS

Marcelo Maraschin
Amélia R. Somensi Zeggio
Maíra M. Tomazzoli
Simone K. Oliveira
Fernanda Ramlov
Maria Beatriz Veleirinho
Miguel Rocha

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Metaboloma e métodos analíticos

No presente, a humanidade vive uma revolução cultural caracterizada pelos avanços tecnológicos e pelo intenso fluxo de informações, comparável em impacto ao surgimento da agricultura há aproximadamente 10 mil anos e à Revolução Industrial iniciada no século XVIII¹. Algumas inovações

tecnológicas ocorridas nas três últimas décadas levaram a uma nova forma de pensar os sistemas biológicos e, principalmente, de pesquisá-los^{2,3}. Na área biológica, o marco inicial desta revolução foi denominado de era genômica, sendo caracterizado pelo desenvolvimento, padronização e otimização das técnicas de engenharia genética⁴. Os ensaios genômicos evoluíram rapidamente, e o imenso volume de dados genéticos possibilitou o aprofundamento da análise das variações temporais e espaciais no acúmulo de transcritos, proteínas e metabólitos. Essa nova fase da atual revolução na área biológica foi denominada de era pós-genômica, ou da genômica funcional⁵.

O termo metaboloma foi cunhado em 1998, denominando a análise da concentração relativa de metabólitos resultante de modificações no padrão de expressão gênica⁶. A metabolômica tem como pressuposto uma abordagem holística e interativa de análise, segundo a qual o metabolismo celular é efetivamente entendido como uma rede complexa de reações altamente ordenadas e interconectadas, de modo que mesmo pequenas alterações, como a diminuição na concentração ou atividade de uma enzima, podem causar modificações simultâneas na concentração de centenas de metabólitos. Desse modo, o metaboloma fornece uma ligação direta entre o genoma, o transcriptoma e o proteoma, podendo revelar quais fatores influenciam diretamente uma dada função biológica⁷⁻⁹.

A originalidade do uso do termo metaboloma proposto por Oliver e colegas (1998)⁶ deve-se não a inovações nas técnicas analíticas utilizadas, mas sim ao estabelecimento do uso conjunto daquele ferramental de análise como complemento às outras áreas “ômicas”⁴. A partir de então, o termo passou a designar uma estratégia de análise bastante complexa, que se refere ao levantamento qualitativo e quantitativo dos metabólitos presentes em um organismo, ou em um dado componente deste (tecidos ou células, por exemplo), denominando-se metaboloma parcial neste último contexto^{6,10-12}.

Alterações induzidas geneticamente, epigeneticamente ou por influência do ambiente são manifestadas, em última instância, através de alterações na composição e concentração de metabólitos. Assim, comparando-se os perfis metabólicos gerados em tecidos que diferem geneticamente ou no seu estado epigenético diferenças genômicas funcionais podem ser inferidas^{2,4,10,13}.

Até o presente, a utilização de uma única técnica analítica não possibilita a obtenção do quadro metabolômico completo de uma dada amostra, sendo necessária a adoção de um conjunto interdisciplinar de abordagens que integra a biologia, a química analítica, a química orgânica, a quimiometria e a informática¹². As técnicas analíticas comumente utilizadas na metabolômica são as cromatografias líquida (CL) ou líquido-gasosa (CG), associadas ou não

à espectrometria de massas (EM) e as espectroscopias de infravermelho (espectroscopia vibracional de infravermelho médio, ou *Fourier-transform infrared spectroscopy* – FTIR; e espectroscopia vibracional de infravermelho próximo, ou *near infrared spectroscopy* – NIR) e de Raman, bem como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN), de carbono (^{13}C -RMN) e de nitrogênio (^{15}N -RMN), em suas abordagens experimentais uni (1D) e bidimensionais (2D) e também quantitativas, isto é, espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa – qRMN^{14,15,16,17}.

Os estudos metabolômicos podem ser conduzidos de modo seletivo ou de modo não seletivo. No caso das análises seletivas, a atenção focaliza-se na caracterização de um composto, ou de um conjunto destes, pertencente a uma classe específica de metabólitos (*target compounds*), permitindo um aumento na sensibilidade e, normalmente, preocupando-se com a quantificação do(s) analito(s). Técnicas de CL, CG e qRMN são normalmente utilizadas nessa forma de análise. De outra maneira, as análises conduzidas no modo não seletivo visam à observação simultânea do maior número de compostos nas amostras, podendo gerar perfis metabólicos (*metabolic profiles*) ou padrões metabólicos (*metabolic fingerprints*) característicos de um dado fenótipo. Técnicas como 1D e 2D-RMN, FTIR, NIR e EM normalmente são utilizadas na execução dessa abordagem analítica não seletiva^{8,11,18}. As características básicas das técnicas analíticas mais frequentemente utilizadas e suas aplicações na análise metabolômica são mostradas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Técnicas analíticas de uso corrente, suas características e aplicações em estudos metabolômicos

| TÉCNICA ANALÍTICA | CARACTERÍSTICAS | APLICAÇÕES |
|-------------------|---|---|
| CG-EM | Alta sensibilidade, analitos voláteis somente, baixo custo | Metabólito(s) alvo(s) e metabolômica |
| CL-EM | Alta sensibilidade, analitos não voláteis/ termoinstáveis, alto custo | Metabólito(s) alvo(s), perfil metabólico e metabolômica |
| RMN | Baixa sensibilidade, alta reprodutibilidade, não destrutiva, alto custo | Perfil metabólico, padrão metabólico (<i>fingerprint</i>) e fluxo metabólico |
| EM | Alta sensibilidade, alto custo, usualmente acoplada à técnica de separação | Metabólito(s) alvo(s), perfil metabólico, padrão metabólico (<i>fingerprint</i>), metabolômica e fluxo metabólico |
| FTIR, NIR e Raman | Baixa resolução, alta reprodutibilidade e rendimento, não destrutiva, baixo custo | Padrão metabólico (<i>fingerprint</i>) |

Após a geração dos dados metabolômicos, estes são geralmente tratados através de métodos de análise multivariada, em função do enorme volume

de informações que deve ser considerado (32 mil dados/espectro ^1H -RMN, por exemplo) e também porque grande parte do que se deseja elucidar são relações complexas, lineares ou não lineares. O uso da matemática e de ferramentas da estatística à análise de um (mega)conjunto de informações químicas recebe a denominação de quimiometria. Os métodos de análise multivariada normalmente utilizados na quimiometria incluem a análise dos componentes principais (PCA), a análise de agrupamentos hierárquicos (AH), a regressão múltipla e as análises discriminatória, fatorial e canônica^{12,19}. O uso combinado dessas ferramentas, que serão descritas mais detalhadamente na Seção 1.4, permite a extração de conhecimento útil a partir dos dados em bruto, incluindo a identificação dos metabólitos nas amostras, os metabólitos cuja concentração varia mais significativamente entre grupos de amostras, o agrupamento de amostras e/ou metabólitos por similaridade, ou ainda a classificação das amostras em grupos consoante aos dados metabolômicos.

1.2 HISTÓRICO

A partir do final do século XIX, a química analítica tem experimentado um intenso processo de evolução, levando à descoberta e ao desenvolvimento de novas moléculas com uma ampla gama de aplicações industriais. Para tal, um contínuo desenvolvimento de técnicas e métodos analíticos tem sido observado, buscando otimizar o desempenho destes através da geração de resultados com maior confiabilidade, rapidez e baixo custo.

Em muitos casos, a análise química é utilizada em estudos bioquímicos (química bioanalítica ou bioanálise), onde a quantidade do analito de interesse é bastante pequena, de modo que o uso de técnicas de grande seletividade e sensibilidade é de fundamental importância. De fato, em bioanálise há uma contínua demanda à determinação de compostos em matrizes complexas, isto é, biofluidos, cujos níveis de concentração situam-se, não raro, na faixa de pico/fentomol ($10^{-12}/10^{-15}$ M). Este aspecto é especialmente importante, por exemplo, no desenvolvimento de farmoquímicos mais potentes, os quais podem ser administrados em concentrações mais baixas²⁰.

Em estudos metabolômicos, é frequente o uso de material amostral de alta complexidade química, a exemplo do observado em extratos de tecidos vegetais e animais, de micro-organismos e biofluidos. Assim, é mister considerar que o efeito da complexidade da matriz amostral poderá gerar um conjunto de dados com baixa precisão em alguns casos. A estratégia usual

para superar essa dificuldade baseia-se na utilização de métodos analíticos sequenciais em bioanálise, de modo a reduzir o efeito de fontes de perturbações (*noise*) oriundas da matriz e/ou do instrumental. A abordagem mais simples nesse contexto considera, inicialmente, a adoção de procedimentos de pré-tratamento amostral (*clean-up*), buscando isolar ou pré-concentrar o(s) composto(s) de interesse, contribuindo à seletividade do processo dessa forma. Para a remoção de compostos de alto peso molecular (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, por exemplo) e enzimas, a desnaturação, a ultrafiltração, a diálise e a permeação em gel poderão ser utilizadas. Além disso, a extração em sistemas líquido-líquido, ou em fase sólida, poderá ser útil à remoção de sais, ou ainda como etapa final no processo de purificação do composto. A despeito do número de etapas de pré-tratamento da amostra, é importante considerar nessa fase os riscos de contaminação, a adsorção irreversível dos analitos à matriz de separação, a decomposição da amostra e a não reprodutibilidade de alguma etapa no processo analítico sequencial^{20,21}. Adicionalmente, enfatiza-se a necessidade de padronização de métodos de pré-tratamento amostral em análise metabolômica, especialmente em estudos intra/interlaboratorial de natureza comparativa e de estabelecimento de padrões metabólicos²². Assim, independentemente da técnica analítica subsequente a utilizar, isto é, seletiva ou não seletiva de analitos, a precisão observada no conjunto de dados metabolômicos mostra-se como função direta de protocolos padronizados de preparo amostral.

Após a etapa de preparo amostral (se necessário), considera-se a utilização de técnicas seletivas e de boa resolução, por exemplo, CL e CG, usualmente acopladas à EM, na análise quali/quantitativa de metabólitos de forma adequada aos objetivos de estudos metabolômicos focados em compostos alvos (*target metabolites* – Tabela 1.1). Essa realidade tornou-se possível a partir das décadas de 1950 e 1960, com o lançamento dos primeiros cromatógrafos gasosos, e expandiu-se nos anos 1980, com a adoção de colunas capilares e o acoplamento à espectrometria de massas, possibilitando a identificação simultânea de centenas de compostos em matrizes complexas²³⁻²⁷. De forma similar, a análise de moléculas não voláteis e termoinstáveis avançou mais significativamente com o desenvolvimento da CL, notadamente a partir dos anos 1980²⁰. Em função do exposto, quando a análise metabolômica busca identificar compostos-alvos, observa-se a necessidade de utilização de técnicas que sejam simultaneamente seletivas e com alta sensibilidade, possibilitando a obtenção de dados robustos na análise de amostras biológicas. Infelizmente, os sistemas de detecção utilizados isoladamente não oferecem, na maioria das vezes, a seletividade necessária, de

modo que a detecção do composto de interesse pode ser dificultada pela interferência de outras moléculas de alto ou baixo peso molecular, com natureza hidrofóbica ou hidrofílica, as quais ocorrem frequentemente em altas concentrações na matriz da amostra²⁸.

Uma segunda abordagem experimental em análises do metaboloma assume como pressuposto a não seletividade de alvos metabólicos em matrizes complexas de interesse. A obtenção de perfis metabólicos (*metabolic profiles*) associada ao estudo da função dos metabólitos^{27,29,30} encontra nas técnicas de EM e RMN suas principais ferramentas (Tabela 1.1).

1.3 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS E INDUSTRIAIS

Nos últimos anos, é possível observar o crescimento contínuo das aplicações da metabolômica em diversas áreas de importância tecnológica. Por exemplo, um conjunto de métodos tem sido estabelecido para a determinação do metaboloma diferencial de alimentos (ou matérias-primas) transgênicos e não transgênicos^{31,32}, para a identificação de marcadores bioquímicos de tumores³³⁻³⁵, bem como para o estudo da diversidade biológica de espécies de interesse medicinal³⁶⁻³⁸ e alimentar^{18,39-41}. Nesse contexto, na sequência utilizar-se-á como modelo de estudos a análise metabolômica da própolis catarinense, a partir de um megaconjunto de dados espectrais de 1D e 2D-RMN e ferramentas de bioinformática. Um resumo esquemático do modelo de estudos proposto é descrito na Figura 1.1.

A análise metabolômica baseada na aplicação de métodos de reconhecimento de padrões de dados espectrais de 1D-RMN de referência (*metabolic fingerprint*) ou compostos alvo (*target metabolites*) a amostras de extratos hidroalcoólicos de própolis é uma abordagem de interesse ao controle de qualidade daquela matriz complexa visando à sua discriminação em função dos efeitos da sazonalidade sobre sua composição química, com importantes desdobramentos quanto às suas aplicações terapêuticas e industriais.

1.3.1 Controle de qualidade de extratos hidroalcoólicos de própolis – classificação de amostras de própolis em função dos efeitos de sazonalidade

Própolis é o termo genérico aplicado a uma complexa mistura de substâncias, elaborada por abelhas *Apis mellifera* L. a partir de produtos de seu

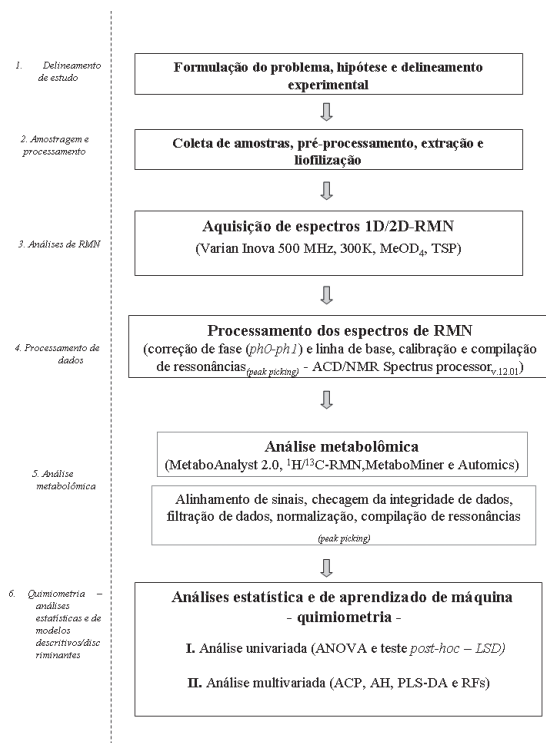


Figura 1.1 Fluxograma das etapas do modelo de estudo para a análise metabolômica da própolis produzida em Santa Catarina, 2010.

próprio metabolismo, isto é, as ceras, de material resinoso e balsâmico coletado de ramos, flores, brotos e exsudados da flora local e também de biomassas (pólen, por exemplo) introduzidas durante sua produção. Estima-se que em torno de 4% a 15% de compostos voláteis e das substâncias coletadas na flora sofram algum tipo de modificação na sua estrutura química por ação do aparato enzimático salivar das abelhas^{42,43}. A própolis possui uma composição química bastante complexa, sendo os constituintes solúveis os materiais cerosos (em média 30%), bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos. Mais de 300 compostos de baixo peso molecular já foram identificados naquela biomassa, dentre eles: flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, vitaminas (A, B1, B2, B6, C e PP) e minerais (Mn, Cu, Ca, Al, Si, V, Ni, Zn e Cr)⁴⁴.

O uso da própolis é documentado desde as mais remotas civilizações até os tempos atuais. No Egito Antigo, por exemplo, foi utilizada para embalsamar os mortos, e durante a Segunda Guerra Mundial foi adotada em clínicas

soviéticas para a cicatrização de lesões⁴⁵, bem como para o tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite⁴⁶. Relatos empíricos sobre o uso de extratos de própolis na medicina popular associados a estudos científicos demonstram ser a própolis um promissor agente terapêutico, devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, antioxidantes, antitumorais e imunomoduladoras⁴⁷. Atualmente, a própolis é um importante produto na medicina alternativa e complementar dos países europeus, Américas do Sul e do Norte e principalmente do Japão⁴⁸.

As primeiras análises químicas de própolis foram realizadas com amostras originárias da Europa e demonstraram a presença de flavonoides agliconas, ácidos fenólicos e seus ésteres. Em 1926, Jaubert constatou a origem vegetal da própolis ao isolar crisina dessa matriz complexa, sendo esse flavonoide também encontrado na espécie *Populus nigra* L. var. *pyramidalis*, a qual vegetava no local da colmeia⁴⁹. No início dos anos 1990, a própolis dos trópicos atraiu a atenção dos cientistas, os quais concluíram se tratar de um produto de composição química bastante distinta comparativamente às amostras europeias. Estes achados indicavam que comparar própolis de regiões produtoras geograficamente discrepantes poderia ser o mesmo que comparar extratos de plantas de distintas famílias⁵⁰. Assim, ainda que algumas atividades biológicas da própolis lhe sejam intrínsecas, isto é, as atividades antioxidantes e antibacterianas, sua composição química é altamente variável em função da flora apícola da região produtora, do componente genético da abelha, da sazonalidade e do método de coleta utilizado, por exemplo. Tais variáveis determinam em alguma extensão as eventuais discrepâncias de atividades farmacológicas de amostras daquela biomassa⁵¹, com efeitos óbvios sobre a qualidade do insumo das indústrias farmacêutica e de cosméticos, por exemplo. Uma consequência resultante desse cenário refere-se à compulsoriedade da caracterização química da própolis em estudos de sua atividade biológica e no desenvolvimento de produtos de interesse à saúde humana e animal. Além disso, para efeitos de aceitação oficial dos sistemas de saúde, em alguns países a comercialização de produtos derivados da própolis requer a padronização química dos extratos daquela matriz como forma de garantir a qualidade, eficiência e segurança do produto final⁵⁰.

Devido à grande biodiversidade dos trópicos, a identificação da(s) espécie(s) vegetal(is) fonte(s) de resina(s) da própolis tende a ser mais complicada em relação às zonas temperadas⁵². Em um ambiente tão biodiverso quanto o território brasileiro, as possibilidades de ofertas de resinas às abelhas são

inúmeras, gerando insumos com ampla gama qualitativa e quantitativa de efeitos biológicos.

A literatura demonstra a tipificação de amostras de própolis no Brasil oriundas de regiões geograficamente distintas, associando-as a atividades biológicas específicas, via uso de marcadores bioquímicos. A própolis brasileira foi classificada em doze tipos segundo o perfil químico obtido via técnicas espectrofotométricas e cromatográficas, além da avaliação das atividades antimicrobianas e antioxidantes⁵². Foram detectadas diferenças qualitativas e quantitativas na composição química e atividades biológicas das amostras estudadas, sendo que os tipos 3 (região Sul), 6 (região Nordeste) e 12 (região Sudeste) apresentaram maior atividade inibitória do crescimento de *Streptococcus mutans*^{52,53}. Estudos adicionais revelaram uma composição química distinta das própolis tipo 6 em relação aos demais tipos, principalmente pela completa ausência de flavonoides e a presença de compostos de natureza mais apolar, isto é, ácidos graxos^{52,54}.

Em trabalho similar visando padronizar a própolis brasileira, propôs-se⁵⁵ o uso de alguns ácidos fenólicos como marcadores bioquímicos em sistemas de análise cromatográfica (cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE), classificando as própolis das regiões Sul e Sudeste em quatro tipos principais: BRG, BRP (PR), BRP e BRPG. A própolis do tipo BRG apresenta como marcadores os compostos vanilina, 3-metoxi-4-hidroxicinamalaldeído e 2-[1-hidroximetil]-vinil-6-acetil-5-hidroxicumarano, sendo encontrada nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O tipo BRP (Paraná) caracteriza-se pela presença de ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), 9-*E*- e 9-*Z*-2, 2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DCBEN) e ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (DPB), sendo típica desse estado. A própolis BRP, originária de São Paulo e Minas Gerais, apresenta como marcadores principais os ácidos cafeico (CAF), 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA) e o ácido *p*-cumárico, enquanto a própolis BRPG constituiu uma interface entre os tipos BRP (Paraná) e BRG, caracterizando-se pela presença de compostos desses dois grupos. Embora haja uma grande variabilidade de composição química entre as amostras estudadas, constatou-se que a própolis brasileira apresenta um marcador principal, o DHCA, também denominado de Artepillin C®, um composto de reconhecido efeito antitumoral patenteado pelos japoneses.

A padronização de extratos de própolis a partir do uso de marcador(es) bioquímico(s) associados à origem geográfica daquela biomassa deverá considerar que este(s) é(são) obrigatoriamente constituinte(s) químico(s) da flora local da região produtora, um aspecto que não raro constitui-se em

impedimento técnico à adoção de um marcador bioquímico de abrangência universal⁵⁰. Assim, se o desenvolvimento de produtos eficazes, seguros e de qualidade derivados da própolis tem como pressuposto compulsório o estabelecimento de perfis de composição química determinantes da(s) atividade(s) farmacológica(s) específica(s), a padronização dos extratos de própolis numa dimensão geográfica mais restrita, isto é, regional, se mostra mais credível comparativamente ao âmbito estadual ou nacional, assumindo-se os efeitos dos fatores (a)bióticos típicos sobre o conteúdo de compostos bioativos-alvos, por exemplo flavonoides⁵⁶, derivados do ácido cinâmico e seus ésteres^{42,57} e diterpenos^{57,58}. De fato, em um país de dimensões continentais e mega-biodiverso como o Brasil, estratégias de padronização química/atividade(s) biológica(s) dos extratos da própolis em âmbito nacional não se mostram adequadas como suporte ao setor produtivo, conforme previamente observado^{44,46,55}. Por fim, ressalta-se que para além dos trabalhos de caracterização química da própolis associada às atividades biológicas de interesse, estudos demonstram a viabilidade da aplicação de abordagens analíticas químicas, usuais em estudos metabolômicos, focando a determinação da origem geográfica daquela biomassa e subsidiando o requerimento de registro de indicação geográfica desta^{52,59}, ainda que em número pouco expressivo, considerando a importância terapêutica/profilática e econômica da própolis^{60,61}.

A própolis proveniente da Europa é a mais estudada e conhecida, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico, caracterizando-se por uma alta concentração de flavonoides⁵⁰. Um dos compostos fenólicos mais estudados naquela biomassa é o éster fenílico do ácido cafeico, que foi identificado como seu principal composto antifúngico e bactericida⁶², apresentando também outras propriedades farmacológicas importantes como a antitumoral⁶³, a antioxidante⁶⁴ e a propriedade de inibir a síntese da integrase VIH-1, envolvida na replicação do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)⁶⁵. Os diversos achados em relação à própolis europeia levaram ao desenvolvimento de um método de tipificação dessa matriz, por meio da análise de sete compostos fenólicos (isto é, *target metabolites*) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguida da determinação espectrofotométrica UV-Vis (espectrofotometria ultravioleta-visível) dos conteúdos totais de flavonas e flavonóis, flavonovas e dihidroflavonóis e compostos fenólicos. Essa abordagem discrimina se dada amostra de própolis é proveniente dos exsudatos dos meristemas de álamo^{66,67}.

Embora os flavonoides sejam os principais componentes da própolis europeia, o mesmo não se pode dizer da própolis brasileira, na qual

quantidades inferiores daqueles metabólitos secundários parecem ocorrer⁵⁵. De fato, em geral a própolis brasileira é caracterizada principalmente pela presença de poucos flavonoides, por exemplo, canferide 5,6,7-triidroxi-3,4'-diidroxiflavona, aromadendrina-4-metil éter⁶⁸, pinobanksina⁶⁹, crisina e galangina⁵⁵. Em amostras provenientes da região Nordeste, por exemplo, detectou-se a completa ausência de flavonoides e a presença de compostos de natureza mais apolar, como os ácidos graxos⁵². Ressalta-se que esse tipo de própolis mostrou-se mais efetiva na inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*⁷⁰, o que leva a supor que a ausência de flavonoides não significa necessariamente uma própolis de qualidade inferior. De outra forma, parece haver um predomínio de compostos derivados de ácidos fenólicos com atividades biológicas importantes em extratos de própolis brasileira, a saber: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (DPB), 9-E- e 9-Z-2, 2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DCBEN) e 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA)^{71,72}.

Por essa razão, dependendo do objetivo do estudo, a caracterização da própolis tropical de maneira similar à europeia pode conduzir a erros, uma vez que as técnicas de CLAE e a espectrofotometria UV-vis não são adequadas à análise de ceras e terpenoides⁷³, por exemplo. Numa abordagem analítica alternativa à CLAE-UV-Vis, amostras de própolis cubanas foram investigadas em sua composição química via ¹H- e ¹³C-RMN, CLAE e CLAE-EM. Os resultados permitiram a classificação daquela biomassa em três grupos consoante aos seus marcadores bioquímicos principais. A própolis cubana marrom caracterizou-se pela presença de benzofenona poli-isopreniladas (em especial nemorosona) e seus derivados, enquanto isoflavonoides, associados ou não a componentes alifáticos (terpenoides e esteróis) foram típicos da própolis vermelha. Por sua vez, a própolis amarela apresentou perfis espectrais com ressonâncias predominantes na região alifática isto é, 0,00-3,00 ppm⁷⁴. Em seu conjunto, os resultados sugerem que a adoção de uma ferramenta analítica não seletiva, isto é, RMN, para a obtenção de perfis metabólicos mostrou-se adequada à discriminação de tipos de própolis, por sua habilidade em detectar simultaneamente compostos fenólicos, ceras e terpenoides. Mais recentemente⁷⁵, em abordagem analítica similar (1D e 2D-RMN) foram identificados perfis metabólicos de amostras de própolis do Sul do Brasil (estado de Santa Catarina) com sinais típicos na região alifática, associados a grupos funcionais acetil (COCH₃, 2,07-2,37 ppm) e da fração alceno (C-CH₂-C, 1,30-1,33 ppm; C-CH-C, 1,21 e 1,47 ppm) de ácidos graxos e ceras comumente encontrados naquela biomassa.

Em função do exposto, no contexto de estudos metabolômicos, observa-se que a análise de matrizes complexas, isto é, própolis, pode focar em compostos-alvo de interesse específico (*target metabolites*), requerendo, portanto, técnicas analíticas seletivas, ou ainda adotar uma abordagem mais ampla, em que se busca identificar o máximo possível de compostos químicos a partir de técnicas não seletivas (*metabolic profile*). Nesse último caso, o conjunto de dados gerados permite a obtenção de informações adicionais associadas a padrões metabólicos, quando aplicado à construção de modelos de descrição e classificação através de técnicas estatísticas multivariadas (*metabolic fingerprint*) – Tabela 1.1. Independentemente da abordagem analítica de investigação metabolômica e considerando-se as características intrínsecas da(s) técnica(s) adotada(s), ressalta-se a necessidade de padronização e estudos de validação intra/interlaboratorial do(s) método(s) utilizado(s), conferindo-lhe(s) a necessária confiabilidade e robustez³².

A partir de um cenário de escassas informações relativas à composição química da própolis originária de Santa Catarina, adotou-se uma estratégia de estudos metabolômicos constituída por duas etapas: i) determinação do perfil metabólico via técnicas analíticas não seletivas (1D/2D-RMN e FTIR) associadas à construção de modelos descritivos e de classificação à geração de padrões de reconhecimento da origem geográfica amostral (*metabolic fingerprint*); e ii) análises de compostos-alvos de elevado valor agregado detectados a partir dos perfis metabólicos, através de técnicas analíticas seletivas (CLAE-UV-Vis, CLAE-EM). A hipótese de trabalho considera que a sazonalidade altera o perfil metabólico da própolis catarinense, em função da ação dos fatores climáticos sobre a flora apícola. Na sequência, serão descritos com algum detalhamento os procedimentos experimentais adotados na etapa (i) das análises metabolômicas, com ênfase nas análises de espectroscopia de RMN.

1.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL – PERFIS METABÓLICOS E PADRÕES DE RECONHECIMENTO DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS CATARINENSE

1.4.1 Material amostral – coleta e preparo

No ano de 2010, amostras de própolis catarinense (100 g/amostra, n = 59, 16 cidades) foram coletadas no outono (AU, abril, n = 15), inverno

(WI, julho, $n = 13$), primavera (SP, outubro, $n = 15$) e verão (SM, janeiro, $n = 16$), em cinco regiões geográficas do estado de Santa Catarina (leste, $n = 7$; central, $n = 7$; serrana, $n = 12$; norte, $n = 7$; e oeste, $n = 26$). Um aparato denominado coletor inteligente foi previamente instalado nas colmeias como estratégia de uniformização dos procedimentos de coleta, dado aos reconhecidos efeitos que esta prática tem sobre o perfil químico da própolis⁷⁶. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas, seladas, identificadas e transferidas ao laboratório. Um procedimento padrão de limpeza e seleção das amostras foi executado, seguido do armazenamento destas em embalagens plásticas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior análise.

1.4.2 Extração

A obtenção dos extratos de própolis utilizou uma solução de etanol: água (70:30, v/v), por ser aquele solvente orgânico o mais utilizado à produção comercial de extratos de própolis⁷⁶. A um volume de 25 ml de solução extratora, 2 g de própolis foram adicionados, seguido de maceração em gral e pistilo com o auxílio de N_2 líquido, e incubação a $70\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ min.}$, sob agitação constante e ausência de luz. O extrato hidroalcoólico (EH) foi coletado, centrifugado (5.000 rpm/5 min.), recuperando-se o sobrenadante e corrigindo-se o volume final a 25 ml com a solução extratora, seguido de liofilização.

1.4.3 Espectroscopia de RMN uni e bidimensional

O EH liofilizado (50 mg) foi adicionado de 700 μl de metanol deuterado (MeOD_4) e centrifugado (5.000 rpm/10 min.), coletando-se o sobrenadante (650 μl) e transferindo-o a tubo de RMN com 5 mm de diâmetro interno. Como padrão interno, utilizou-se o sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico- d_4 (sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico- d_4 deuterado – TSP d_H 0,00 ppm – 0,4 mM, pH = 3,8)⁷⁷.

Para obter espectros comparáveis, estes foram obtidos utilizando-se os mesmos parâmetros de configuração e considerando-se um período de um minuto para a estabilização da amostra na sonda de detecção, previamente à aquisição dos dados.

Os espectros de alta resolução foram adquiridos em equipamento Varian Inova 500 MHz, equipado com sonda BBI (5 mm) de detecção inversa e

bobinas geradoras de gradiente de campo (coordenada z), operando em frequência de ressonância de 500,13/125,03 MHz (11,7 Tesla) de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$. Os parâmetros de aquisição dos espectros de ^1H -RMN foram configurados após ensaios preliminares, conforme segue: tempo de aquisição de 4 s (*acquisition time*), tempo de espera 2 s (*delay time*) e tempo de reciclagem 6 s (*recycle time*), ao longo de uma janela espectral de 8000 Hz, com supressão do sinal de água (4,87 ppm, sequência de pulso Watergate, extensão de pulso 8,5 μs – 90°, nível de potencial 50 dB, 300 K) e tempo de mistura 12 ms (*mixing time*).

O tempo de reciclagem de 6 s mostrou-se adequado, evitando significativamente (< 10%) a saturação de sinais, isto é, $3T_1$ s. Para cada amostra, 32/2.000 varreduras ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, respectivamente) foram realizadas, coletando-se 16 K (^1H) e 32 K (^{13}C) pontos (*time domain*) em modo de intensidade absoluta. Os dados espectrais foram processados utilizando-se 64 K pontos, através de uma rotina implementada no programa ACD/Spectrus processor (v.12.01 – Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario, Canada), consistindo de multiplicação exponencial ($\text{lb} = 0,5$ Hz), ajuste de fase automático (*ph0* e *ph1*), correção da linha de base e calibração manual em relação ao sinal do padrão interno (TSP d_H 0,00 ppm).

Os experimentos de 2D-RMN incluíram registros de correlação total ($^1\text{H}/^1\text{H}$, TOCSY), de correlação heteronuclear ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, HSQC) e eventualmente de difusão ordenada (DOSY) e de correlação por acoplamento J (“ J -resolved Spectroscopy”), sendo que somente os parâmetros das duas primeiras abordagens experimentais de 2D-RMN serão descritos. Os espectros de TOCSY foram obtidos em modo de fase sensível, com incremento de fase proporcional ao tempo (TPPI) e sequência de pulso *wgtocsy* (largura espectral de 7992,19 Hz em F1 e F2, 1024-F1/512-F2 pontos de dados e tempos de aquisição, associação e de relaxação de 0,1280 s-F1/0,0320 s-F2, 100 ms e 1,5 s, respectivamente).

Os espectros de correlação heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) foram adquiridos utilizando-se a sequência de pulso *gChsqc* e os parâmetros que seguem: número de varreduras 8, varreduras fictícias 4 (*dummy scans*), número de pontos (*time domain*), 1.024 [F2 – ^1H] e 512 [F1 – ^{13}C], janela espectral de 7.992,19 Hz (F2) e 21.080,12 Hz F1, resolução digital 1,8777 Hz (F2) e 200,020 Hz (F1), tempo de aquisição 0,1280 s-F2/0,0121-F1, tempo de espera 0,6 s. A escolha dessa técnica de correlação heteronuclear com o desacoplamento dos sinais de ^{13}C baseia-se no fato de que ela propicia um número elevado de sinais bem definidos e não requer o ajuste de fase no processamento dos dados, evitando a inserção de dados espúrios durante o

cálculo e processamento espectral⁷⁶. As configurações utilizadas permitiram a obtenção de espectros bidimensionais com boa resolução, reduzindo significativamente as dificuldades de associação das ressonâncias aos metabólitos derivadas da sobreposição de sinais tipicamente observada em espectros de ¹H-RMN⁷⁸.

Os dados espectrais de 2D-RMN foram processados utilizando-se uma rotina implementada no programa ACD/Spectrus processor (v.12.01 – Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario, Canada), considerando a calibração dos espectros a partir do sinal do padrão interno (TSP, d_{1H e 13C} 0,00 ppm) e a correção da linha de base. Adicionalmente, aos dados espectrais de HSQC em F1 e F2 foram aplicadas durante o processamento uma função e uma constante quadrática sinoidal⁴⁰.

1.4.4 Análise de dados espectrais de 1D e 2D-RMN

O uso da RMN de alta resolução uni e bidimensional nas amostras de própolis gera uma grande quantidade de informações, as quais podem ser extraídas do conjunto de dados recolhido. No presente estudo, estes correspondem a 59 amostras, tendo sido coletadas três réplicas técnicas por amostra na fase de aquisição dos espectros de RMN. Dado que as réplicas se mostraram muito fiéis entre si, com um grau de variabilidade muito reduzido, usou-se na análise de dados o espectro médio para cada amostra, sem perda de informação.

A análise dos dados espectrais de 1D-RMN utilizou o *software* MetaboAnalyst^{79*}. Esse *software* tem-se afirmado nos últimos anos como uma boa opção ao tratamento de dados de metabolômica, executando uma ampla gama de operações de pré-processamento de dados e de análises uni e multivariadas. Além disso, é uma ferramenta de fácil utilização e acesso, dada a sua disponibilidade a partir de um *web browser* comum.

Em primeiro lugar, a matriz de dados espectrais de ¹H-RMN foi pré-processada, isto é, os espectros coletados (0,20 ppm a 13,00 ppm) foram convertidos em uma lista de picos cuja primeira coluna refere-se ao deslocamento químico (ppm) e a segunda à intensidade do sinal. No total, foram obtidos 25.403 picos, representando uma média de cerca de 430 picos por amostra. Com base nessas informações, procedeu-se ao alinhamento dos picos entre as amostras, de forma a identificar os picos comuns. Nessa operação, foi

* Disponível livremente em versão web em <http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst>.

usado o algoritmo implementado no MetaboAnalyst por omissão, tendo-se usado uma janela móvel de largura 0,03 ppm e um passo de 0,015 ppm. Os picos do mesmo grupo foram alinhados a sua mediana considerando todas as amostras, sendo que ressonâncias com frequência de ocorrência inferior a 25% em cada grupo foram excluídas. Como resultado, foram obtidos 239 picos, em uma matriz de 59 × 239 pontos de dados para posterior análise. O passo adicional constou do tratamento dos valores omissos, tendo sido estes substituídos por um valor de 0,00005, isto é, metade do valor positivo mais baixo permitido nos dados originais, sendo este valor assumido como limite da detecção. Subsequentemente, os dados foram normalizados através da transformação logarítmica destes.

Na etapa seguinte, os dados pré-processados foram submetidos à análise univariada, tendo em conta a sua divisão nas estações de coleta (AU, WI, SP e SM). Esses métodos são comumente utilizados à exploração preliminar dos dados, fornecendo uma visão dos atributos (isto é, ressonâncias) mais relevantes na discriminação das condições em estudo.

Dada à existência de mais de dois tratamentos (estações), realizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida de testes estatísticos *post hoc* (teste LSD de Fisher), permitindo identificar os sinais como maior variabilidade nas suas intensidades entre os tratamentos (estações), bem como os pares de tratamentos nos quais essa variabilidade se mostrou significativa, apresentando o respectivo *p*-value. Os picos mais importantes identificados são mostrados na Tabela 1.2, na qual claramente se nota o predomínio e a significância de compostos com estrutura anomérica (3,00 ppm a 5,50 ppm) nos agrupamentos detectados.

Tabela 1.2 Ressonâncias (1H-RMN, ppm) identificadas via análise de variância (ANOVA). A primeira, a segunda e a terceira colunas representam a ressonância selecionada, o logaritmo dos valores de *p* (*p*-value) e os pares de tratamentos para os quais a diferença é significativa (*p* < 0,05 – teste LSD), respectivamente

| RESSONÂNCIA (PPM) | LOG ₁₀ (P-VALUE) | TESTE LSD FISHER |
|-------------------|-----------------------------|---|
| 4,68 | 24,393 | SM* - AU; SM - SP; SM - WI |
| 4,65 | 19,398 | SM - AU; SM - SP; SM - WI |
| 4,58 | 16,470 | SM - AU; AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,32 | 14,087 | SM - AU; AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,54 | 13,731 | SM - AU; AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |

| RESSONÂNCIA (PPM) | LOG ₁₀ (P-VALUE) | TESTE LSD FISHER |
|-------------------|-----------------------------|---|
| 4,06 | 13,338 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,71 | 12,336 | SM - AU; SM - SP; SM - WI |
| 3,45 | 11,844 | AU - SM; AU - SP; AU - WI |
| 3,39 | 11,677 | AU - SM; AU - SP; AU - WI |
| 4,18 | 11,572 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 3,42 | 11,395 | AU - SM; AU - SP; AU - WI |
| 4,15 | 11,072 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,62 | 10,737 | SM - AU; SM - SP; SM - WI |
| 4,5 | 10,708 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,26 | 10,359 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,47 | 10,296 | SM - AU; AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,29 | 10,270 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,38 | 9,797 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,44 | 9,793 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |
| 4,03 | 9,259 | AU - SP; AU - WI; SM - SP; SM - WI |

* Legenda: SM, verão; AU, outono; SP, primavera, WI, inverno.

Em casos nos quais a estrutura dos dados permite a divisão das amostras em apenas dois grupos (tratamentos), é possível realizar uma análise semelhante à anterior com testes estatísticos baseados na distribuição *t*-student, também disponibilizados pelo *software* MetaboAnalyst.

Uma perspectiva mais completa sobre os dados requer a identificação dos metabólitos presentes em cada amostra, com base em seus sinais de ressonâncias (δ , ppm). Essa operação, por sua vez, requer a análise visual dos espectros, ainda que tal procedimento exija certo grau de conhecimento do usuário e disponibilidade de tempo. O resultado desse processo para os dados referidos anteriormente é mostrado na Tabela 1.3, no qual dezenove metabólitos foram identificados nos EHs, ainda que de forma não homogênea no material amostral, sugerindo o efeito de sazonalidade. A atribuição das ressonâncias aos metabólitos usualmente emprega informações disponíveis em bases de dados (algumas são referidas na Tabela 1.4), literatura

especializada e ferramentas de bioinformática, como, por exemplo, as plataformas MetaboMiner* ou Automics**. Dessa forma, foi possível identificar metabólitos de natureza de ácidos orgânicos, aminoácidos, álcoois, monossacarídeos e compostos aromáticos, por exemplo, eventuais candidatos a marcadores bioquímicos da origem da própolis, consoante às regiões geográficas em estudo.

A título de exemplo, dois espectros de ¹H-RMN de amostras de própolis outonais (2010), originárias das regiões serrana (município de São Joaquim) e oeste (município de Descanso) de Santa Catarina, são mostrados nas figuras 1.2a e 1.2b, com destaque para as janelas espectrais de ocorrência de compostos de estruturas alifática (0,00 ppm a 3,00 ppm), anomérica (3,00 ppm a 5,50 ppm) e aromática (5,50 ppm a 8,50 ppm).

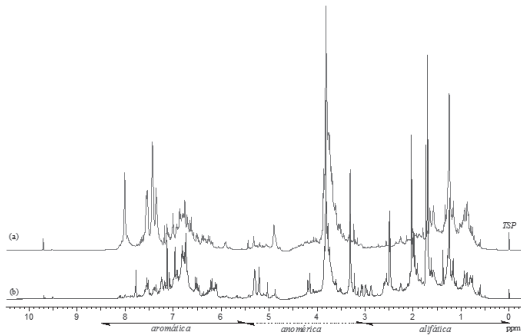


Figura 1.2 Perfis espectrais de ¹H-RMN (500 MHz, MeOD₄, TSP dH 0,00 ppm, pH = 3,8) de amostras de EH de própolis catarinense originárias das regiões (a) serrana (São Joaquim) e (b) oeste (Descanso), coletadas no outono de 2010.

Tabela 1.3 Deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C, multiplicidade de prótons e assinalamentos (500 MHz) de metabólitos de baixo peso molecular (< 1.500 Da) identificados em amostras de própolis catarinense (TSP dH 0,00 ppm – 0,4 mM, pH = 3,8)

| METABÓLITOS | δ, ppm ¹ H (MULTIPLICIDADE, ASSINALAMENTO) – δ, ppm ¹³ C * |
|---------------------|--|
| Ácido b-OH/butírico | 1,21 (d); 2,28 (m); 2,52 (m) – 47,44 |
| Alanina | 1,47 (d, bCH ₃) – 17,52; 4,10 (aCH) – 51,10 |
| Arginina | 2,02 (m, bCH ₂) – 31,72; 3,32 (dCH ₂) – 42,29; 4,10 (t, aCH) – 54,87 |
| Ascorbato | 3,73 (m) – 62,06; 4,01 (m) – 69,06; 4,50 (d) – 77,90 |

* Disponível em <<http://wishart.biology.ualberta.ca/metabominer/>>.

** Disponível em <<https://code.google.com/p/automics/>>.

| METABÓLITOS | δ , ppm ^1H (MULTIPLICIDADE, ASSINALAMENTO) – δ , ppm ^{13}C * |
|-----------------------|---|
| Formiato | 8,43 (s, HCOOH) |
| Fumarato | 6,52 (s) – 136,08 |
| Ácido gálico | 7,07 (s, C2H, C6H-ring) – 117,36 |
| Citrato | 2,84 (dd, a, g CH) – 44,28 |
| b-Fructose | 3,58 (C1H) – 62,65; 3,82 (C5H) – 81,00; 4,10 (C3H) – 75,40 |
| α -Glucose | 3,51 (C2H) – 71,90; 3,84 (C5H) – 71,17; 5,22 (d, C1H) – 94,20 |
| b-Glucose | 3,23 (C2H) – 76,25; 3,41 (C4H) – 71,37; 4,62 (d, C1H) – 98,10 |
| Glicina | 3,85 (s, αCH_2) – 44,29 |
| Isoleucina | 0,89(t) – 11,54; 0,96 (t) – 14,02; 3,77 (m) – 61,55 |
| Lisina | 1,49 (m) – 21,10; 1,72 (m) – 26,01; 1,92 (m) – 31,66; 3,06 (t) – 40,01 |
| Melibiose | 3,27 – 75,20; 3,56 – 73,76; 3,72 – 73,87; 3,83 – 69,78; 3,91 – 70,97; 4,00 – 71,97; 5,00 – 98,92 |
| Ornitina | 1,81 (m) – 25,00; 2,01 (m) – 29,55; 3,06 (t) – 42,18 |
| Prolina | 2,06 (m) – 25,98; 2,18 (m) – 30,10 |
| Piruvato | 2,36 (s) – 29,01 |
| Quercetina | 6,18 (d) – 98,04; 6,87 (d) – 116,11; 7,55 (d) – 119,94; 9,12 (s) – 135,97 |
| Succinato | 2,39 (s) – 33,94 |
| Sacarose | 3,53 (G2H, dd) – 71,07; 3,67 (s, F1H) – 62,66; 5,42 (G1H, d) – 93,25 |
| Tartarato | 4,33 (s) – 72,68 |
| Triptofano | 3,23 (dd) – 28,30; 7,19 (d) – 122,40; 7,33 (s) – 128,20; 7,54 (d) – 114,80 |
| 5-uridina monofosfato | 4,10 – 67,00; 4,22 – 76,66; 4,31 – 71,90; 6,94 – 118,22; 5,90 – 105,21 |
| α -Xilose | 3,52 (dd) – 73,77; 3,63 – 72,91; 3,68 – 61,92; 5,19 (d) – 93,25 |

* Assinalamentos determinados via ^1H -RMM, TOCSY e HSQC.

Fonte: Maraschin *et al.* (2012) e dados não publicados pelos autores.

Tabela 1.4 Bases de dados de referência em estudos metabolômicos

| BASE DE DADOS | URL OU ENDEREÇO NA INTERNET | OBSERVAÇÕES |
|---|---|---|
| Database of biochemical, genetic, and genomic metabolic network reconstruction (BiGG) | http://bigg.ucsd.edu/ | Repositório de dados de metabólitos de bactérias, leveduras e humanos e vias metabólicas – ênfase em biologia sistêmica |
| Biological Magnetic Resonance Data Bank (BioMagResBank) | http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/ | Repositório de dados de RMN de macromoléculas (proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos) e metabólitos |
| Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) | http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html | Base que integra dados genômicos, químicos e de biologia funcional |

| BASE DE DADOS | URL OU ENDEREÇO NA INTERNET | OBSERVAÇÕES |
|---|---|---|
| Fiehn metabolome database | http://fiehnlab.ucdavis.edu/db | Listagem de metabólitos com identificadores (IDs), imagens, sinônimos e conexão com a base de dados KEGG |
| Golm metabolome – Comprehensive Systems Biology Database | http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html | Plataforma de dados de EM e abordagens experimentais em perfis metabólicos e bioinformática |
| Human metabolome database | http://www.hmdb.ca/ | A maior e mais completa base de dados metabolômicos dedicada à espécie humana |
| NIST spectral database | http://webbook.nist.gov/chemistry/ | Base de dados espectrais (EM, FTIR, NIR RMN) e de propriedades químicas e físicas de moléculas |
| Plant Metabolic Network (PMN) | http://plantcyc.org/ | Banco de dados de genes, enzimas, metabólitos e vias metabólicas primárias e secundárias de vegetais |
| Platform for RIKEN Metabolomics (PRiMe) | http://prime.psc.riken.jp/ | Banco de dados espectrais (EM, EM/EM, RMN) e de ferramentas de integração de informações metaboloma/transcriptoma |
| Scripps Center for Metabolomics – METLIN: Metabolite and Tandem MS Database | http://metlin.scripps.edu/ | Repositório de dados de EM em tandem (EM/EM) e metabólitos |
| Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) | http://sdb.sdb.aist.go.jp/ | Banco de dados integrado de espectros (EM, FTIR, Raman, RMN e ressonância de spin eletrônico – RSE) |

1.4.5 Quimiometria

Os dados de metabolômica, como já foi demonstrado na Seção anterior, têm características multivariadas, isto é, cada amostra é caracterizada por diversos valores, nesse caso por um grande número de ressonâncias. Assim, naturalmente, os métodos mais eficientes para a exploração e extração das informações desses dados são métodos de análise multivariada.

Nesse contexto, o primeiro método aplicado aos dados espectrais de 1D-RMN foi a Análise de Componentes Principais (ACP). Trata-se de um método não supervisionado, isto é, que não requer a definição *a priori* de grupos para as amostras, sendo usado essencialmente como um método de redução de dimensionalidade. A ACP, criada em 1901 por Karl Pearson⁸⁰, consiste em um procedimento algébrico que converte as variáveis originais (que são tipicamente correlacionadas) num conjunto de variáveis não correlacionadas (linearmente), que se designam por componentes principais (CPs) ou variáveis latentes. Assim, a ACP fornece um mapeamento de um

espaço com N dimensões (em que N é o número de variáveis originais) para um espaço com M dimensões (em que M é tipicamente muito menor do que N). As CPs são ordenadas pela quantidade decrescente de variabilidade (variância) que explicam. Cada CP é gerada de forma a explicar o máximo de variabilidade da parte ainda não explicada, devendo ser ortogonal às CPs anteriores. É importante notar que a ACP é sensível à escala dos dados, característica devido à qual se recomenda sua normalização prévia. A ACP consiste numa decomposição dos dados originais (uma matriz X) em duas matrizes: $T.P^T$. A matriz T denomina-se *scores* (distribuição fatorial), indicando as coordenadas dos exemplos iniciais (linhas de X) no novo sistema de coordenadas dado pelas CPs. As CPs determinadas são combinações lineares das variáveis originais, sendo os coeficientes destas no espaço original dados pelas colunas da matriz P e designados por *loadings* (contribuição fatorial). Se forem consideradas apenas as primeiras k componentes principais, isto implicará em considerar também apenas as primeiras k colunas das matrizes T e P , obtendo-se uma aproximação dos dados originais que será tanto mais precisa quanto maior for o valor de k .

A aplicação da ACP é realizada usando o *software* MetaboAnalyst, que por sua vez usa uma função implementada (*prcomp*) sobre o sistema R^{81*}. A Figura 1.3 mostra os *scores* das duas primeiras componentes, bem como

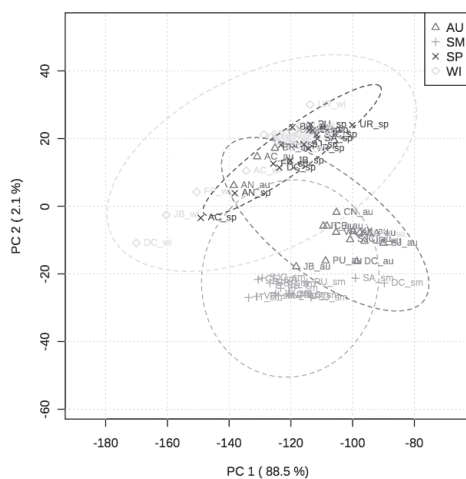


Figura 1.3 Contribuições fatoriais (*scores*) dos componentes principais CP1 e CP2 calculados a partir dos dados espectrais de ¹H-RMN de amostras de própolis catarinense, com o auxílio do *software* MetaboAnalyst.

* Ver <<http://www.r-project.org/>>.

a variância explicada. Note-se que a primeira CP explica mais de 88% da variância amostral. As cores dos pontos revelam os grupos associados às estações do ano, revelando a qualidade da separação gerada por essas duas CPs (notar que essa informação não é usada pelo método).

Uma classe de métodos alternativos, ainda de natureza não supervisionada, está direcionada à tarefa de agrupar as amostras de acordo com suas similaridades. As abordagens para este problema variam sobretudo na forma como se define a similaridade, nos algoritmos usados para realizar o agrupamento e na forma de visualizar e interpretar os resultados. Neste texto, abordar-se-á apenas o *clustering* (agrupamento) hierárquico para os dados em estudo, que constitui a abordagem mais popular para essa tarefa.

O *clustering* hierárquico⁸² tem como principal característica o tipo de resultados que gera. Nesse caso, o resultado final do processo é uma árvore binária que representa possíveis divisões dos dados em *clusters* (grupos). Assim, na raiz, todos os dados estão agrupados num único *cluster*, e ao descer na árvore os *clusters* vão se dividindo de forma binária, ou seja, em cada nó da árvore são criados dois *clusters* pela divisão de um único. O método mais usado para construir essas árvores é designado de aglomerativo, pois se inicia com um *cluster* para cada exemplo (folhas da árvore). Em cada interação, vão se juntando dois *clusters* e criando um único (gerando os nós na árvore), até se atingir o ponto em que todos os *clusters* estão unidos num único. O processo é baseado numa matriz de distâncias em que estão compilados os valores entre todos os pares de objetos. Essa matriz é construída aplicando uma métrica de similaridade sobre as linhas da matriz inicial de

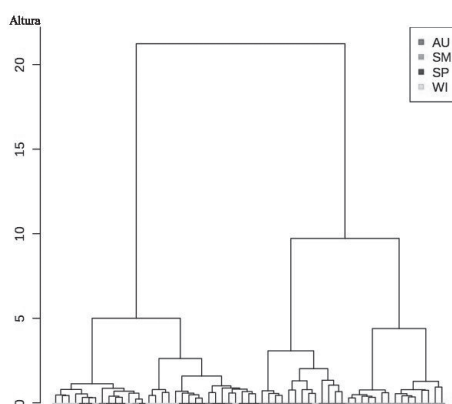


Figura 1.4 *Clustering* hierárquico dos dados espectrais de ¹H-RMN de amostras de própolis catarinense calculado com o auxílio do software MetaboAnalyst. As cores das folhas da árvore denotam os grupos (tratamentos) das amostras.

dados, como, por exemplo, as métricas clássicas de distância euclidiana ou de Manhattan.

O MetaboAnalyst realiza a análise de agrupamentos hierárquicos usando a função (*hclust*) do sistema R e calculando a correlação de Pearson como métrica para a determinação da distância. Os resultados são sumarizados na Figura 1.4, podendo se constatar uma boa separação dos grupos (ainda que essa informação não seja usada pelo método).

Ressalta-se ainda que o processo de *clustering* pode considerar como elemento de agregação os metabólitos (ou no caso em estudo, as ressonâncias). Uma forma de visualizar os dois processos de aglomeração de forma simultânea são os *heatmaps*, conforme exemplificado na Figura 1.5.

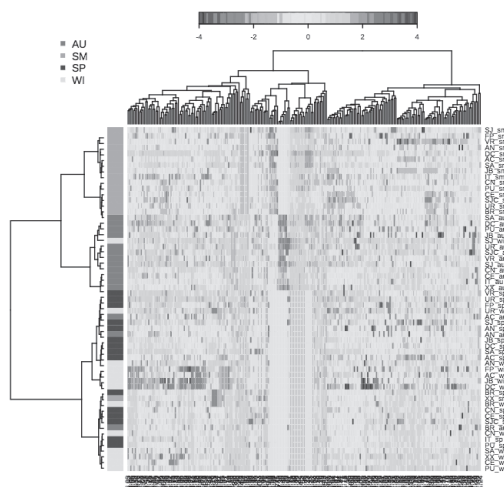


Figura 1.5 *Heatmap* para os dados espectrais de ^1H -RMN das amostras de própolis em estudo. As colunas representam ressonâncias (ppm) e as linhas representam as amostras, sendo as suas cores (lado esquerdo) determinadas pelas estações de coleta (legenda no canto superior esquerdo).

A análise realizada até o momento focou no uso de métodos de natureza não supervisionada, ou seja, pretende-se estudar quais as ressonâncias que distinguem as amostras de grupos (tratamentos) diversos, isto é, estações, mas tal informação não é utilizada na alimentação dos métodos. Adicionalmente, há métodos alternativos a essa abordagem, ditos supervisionados, que permitem usar tal informação para criar melhores modelos discriminativos.

Um dos métodos supervisionados mais utilizados na área da metabolômica é a análise discriminante associada à análise dos quadrados mínimos

parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis* – PLS-DA). Essa análise representa uma extensão da ACP que tira partido da informação sobre os grupos de cada amostra, procurando maximizar a separação entre grupos de observações⁸³. O método funciona pela descoberta de variáveis latentes nos dados, tal como na ACP, porém busca separar os grupos amostrais não maximizando a variância.

A aplicação do método PLS-DA aos dados espectrais (¹H-RMN) da própolis é ilustrada na Figura 1.6, em que uma boa separação dos grupos de amostras usando apenas três componentes principais pode ser observada. Adicionalmente, a Figura 1.7 mostra uma medida da importância das variáveis (ressonâncias) no modelo de classificação construído, identificando aquelas de maior efeito discriminante, quer de forma genérica, quer para cada grupo (tratamento) em particular. Dado que o PLS-DA é um método que pode incorrer com facilidade em sobreajustamento, uma avaliação rigorosa deve ser realizada. Neste caso, o uso de validação cruzada⁸⁴ demonstrou erros de previsão na ordem dos 10%.

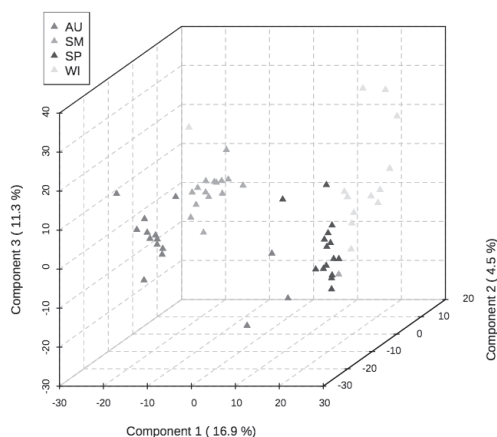


Figura 1.6 Discriminação amostral da própolis catarinense ao longo dos eixos CP1 (16,9%), CP2 (4,5%) e CP3 (11,3%), consoante aos tratamentos (estações) em estudo, a partir da análise discriminante associada ao cálculo dos quadrados mínimos parciais (PLS-DA).

Uma das limitações do método de PLS-DA refere-se à sua dependência da escala dos dados na escolha dos atributos relevantes⁸⁵. Há, porém, métodos alternativos nas áreas da aprendizagem máquina e da mineração de dados em que essa dependência inexistente⁸⁶. Neste estudo, adotou-se a aplicação de árvores de decisão que apresentam em seus nós os atributos (isto é,

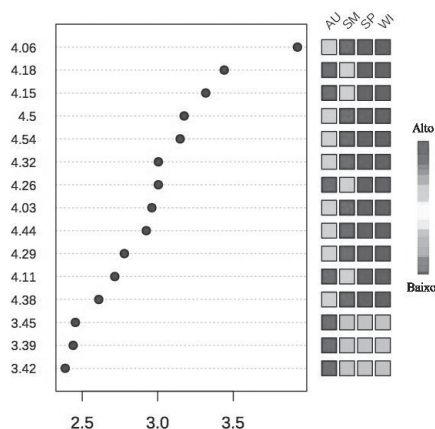


Figura 1.7 Importância das variáveis (ressonâncias, ppm) determinada pelo método PLS-DA para os dados espectrais de ^1H -RMN da própolis catarinense, safra 2010.

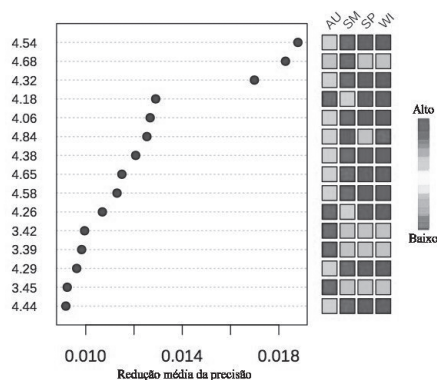


Figura 1.8 Importância das variáveis (ressonâncias) calculadas pelo método RF para os dados espectrais (^1H -RMN) da própolis catarinense, safra 2010.

ressonâncias), enquanto nas folhas tem-se os valores das classes (ou grupos). Mais recentemente, um método que usa conjuntos de árvores de decisão, denominado *random forests* (RFs), vem sendo aplicado à análise metabolômica⁸⁷. Esse método realiza a inferência de centenas de árvores de decisão para um conjunto de dados, sendo posteriormente usadas para prever novos casos via processo de votação baseado nos resultados individuais de cada árvore.

As RFs são também implementadas pelo MetaboAnalyst usando um pacote do sistema R. Aplicando o método aos dados espectrais de 1D-RMN das própolis catarinenses, a estimativa de erro situou-se em torno de 15%. Adicionalmente, o modelo identifica as ressonâncias mais usadas nas árvores de decisão, com boa capacidade preditiva (Figura 1.8).

O conjunto de resultados derivados das análises de PLS-DA e RFs claramente indica ser a região anomérica a de maior efeito discriminante das amostras de própolis em estudo, haja vista que as quinze ressonâncias de maior significância (Figuras 1.7 e 1.8) ocorrem no intervalo entre 3,0 ppm e 5,50 ppm (Figura 1.2), à semelhança do observado na análise univariada (ANOVA-LSD Fischer). Adicionalmente, o erro de previsão observado nos dois modelos mostrou-se similar, não sendo possível inferir alguma vantagem extra na adoção de uma das técnicas para os dados disponíveis. De fato, considerando-se que as técnicas de RFs e PLS-DA usam formas distintas de inferência e classificação, os seus resultados devem ser interpretados como complementares.

1.5 CONCLUSÕES

A análise metabolômica baseada na determinação dos perfis metabólicos de EHs de própolis catarinenses via espectroscopia uni e bidimensional de RMN, associada a modelos de descrição e classificação, permitiu confirmar a hipótese de trabalho. Dezenove compostos foram identificados nas amostras utilizando-se a 1D/2D-RMN, bases de dados de metabólitos e *softwares* dedicados à análise dos perfis espectrais. De fato, variações importantes de composição química foram detectadas naquela biomassa, com maior significância à ocorrência de compostos com estrutura anomérica, conforme revelado pelos modelos de descrição e classificação adotados. Considerando-se a complexidade química típica de EHs de própolis, a rapidez e a robustez da espectroscopia de RMN e a eficiência das ferramentas de bioinformática descritas para o modelo de estudo, constata-se que a análise metabolômica é uma estratégia relevante a estudos descritivos e de classificação daquela matriz complexa, com importantes efeitos para a aplicação industrial, por exemplo, cosmética e farmacêutica, da própolis, notadamente em sistemas de controle de qualidade.

1.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

A metabolômica tem ocupado um lugar importante na bioanálise e na investigação biomédica nos últimos anos, posicionando-se como a mais recente das tecnologias “ômicas”. Um conjunto importante de métodos tem surgido, e novas abordagens analíticas são disponibilizadas a intervalos de tempo que, não raro, demonstram o potencial de desenvolvimento e aplicação dessa área. Este cenário deverá ser ampliado em momentos futuros e de forma rápida, devido à padronização e validação de métodos de coleta, processamento amostral e análise, em paralelo ao contínuo desenvolvimento e aprimoramento do *hardware* e *software* necessários aos estudos metabolômicos. Como exemplo, espectrômetros de RMN equipados com supercondutores de alta potência (isto é, campos magnéticos > 18,8 T – 800 MHz de frequência de ressonância de ^1H) e sondas criogênicas ampliarão significativamente a capacidade de detecção e resolução, otimizando a identificação e a quantificação de metabólitos de menor concentração em matrizes complexas. Concomitantemente, *softwares* dedicados ao processamento e análise do megaconjunto de dados espectrais têm sido desenvolvidos e disponibilizados no mercado a preços acessíveis, quando não gratuitamente. Ademais, o permanente e imprescindível aprimoramento das ferramentas de bioinformática para o tratamento e extração de informações relevantes aos eventos metabólicos claramente sinaliza um futuro de possibilidades concretas quanto à construção de uma visão integrada dos processos bioquímicos, contribuindo para a geração de tecnologias baseadas na genômica funcional nos campos da saúde humana, agricultura e ambiente. Tal perspectiva é ainda mais credível levando-se em conta o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática com código aberto e linguagens de bom desempenho, isto é, R, além da disponibilidade em plataformas virtuais na rede mundial de computadores, com livre acesso aos usuários.

REFERÊNCIAS

1. Pirages D. Diversity and social progress in the next millennium: an evolutionary perspective. *Futures*. 2000;32:513-23.
2. Oliver DJ, Nikolau B, Wuertele ES. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses. *Metabolic Engineering*. 2002;4:98-106.
3. Costa FF. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*. 2008;410:9-17.
4. Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*. 2003;62:817-36.
5. Fell DA. Beyond genomics. *Trends in Genetics*. 2001;17:680-2.
6. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*. 1998;16:373-8.
7. Wood N. Profiling modified metabolomes. *Trends in Plant Science*. 2001;6:191-3.
8. Fernie AR, Schauer N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends in Genetics*. 2008;25:39-48.
9. Keurentjes JJB. Genetical metabolomics: closing in on phenotypes. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009;12:223-30.
10. Bino RJ, Hall RD, Fiehn O, Kopka J, Saito K, Draper J, Nikolau BJ, Mendes P, Ressler-Tunali U, Beaçe MH, Trethewey RN, Lange BM, Wuertele ES, Sumner LW. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science*. 2004;9:418-25.
11. Goodcare R, Vaidynathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*. 2004;22:245-52.
12. Fukusaki E, Kobayashi A. Plant metabolomics: potential for practical operation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;100:347-54.
13. Saghatelian A, Cravatt BF. Global strategies to integrate the proteome and metabolome. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2005;9:62-8.
14. Abhyankar G, Reddy VD, Giri CC, Rao KV, Lakshimi, VVS, Prabhakar S, Vairamani M, Thippeswamy BS, Bhattacharya PS. Amplified fragment length polymorphism and metabolomic profiles of hairy roots of *Psoralea corylifolia* L. *Phytochemistry*. 2005;66:2441-57.
15. Mitchell SC, Carmichael PL. Metabonomics and the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2005;244:10-4.
16. Wind RA, Hu J, Mayors PD. Slow-MAS NMR: A new technology for in vivo metabolomic studies. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2005;2:283-86.
17. Tanaka R, Nitta A, Nagatsu A. Application of a quantitative ¹H-NMR method for the determination of amygdalin in *Persicae sêmen*, *Armeniaceae sêmen*, and *Mume fructus*. *Journal of Natural Medicines*. 2014;68:225-30.

18. Kuhn S, Lemos PMM, Oliveira SK, Silva DA, Tomazzoli MM, Souza ACV, Pinto MRR, Uarrota VG, Cella I, Ferreira AG, Zeggio AS, Veleirinho MBR, Delgadillo I, Vieira FN, Maraschin M. Metabolomics and chemometrics as tools for chemo(bio)diversity analysis – maize landraces and propolis. In: Chemometrics in practical applications. Rijeka: InTech; 2012. Capítulo 1; p. 253-70.
19. Leardi R. Chemometrics in data analysis. In: A user-friendly guide to multivariate calibration and classification. West Sussex: NIR Publications; 2003.
20. Verpoorte R, Maraschin M. Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria de massa na análise de metabólitos secundários vegetais e em biomedicina. In: Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. 1 ed. Chapecó: Unoesc; 2001. Capítulo 1; p. 147-93.
21. Stegehuis DS. On-line chromatographic and electrophoretic techniques for sample pretreatment in bioanalysis [PhD thesis]. Leiden: Leiden University; 1992. 188p.
22. Allwood JW, Erban A, Koning S, Dunn WB, Luedemann A, Lommen A, Kay L, Loscher R, Kopka L, Goodacre R. Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography–electron impact–time of flight mass spectrometry (GC–EI–TOF/MS) based plant metabolomics. *Metabolomics*. 2009;5:479-96.
23. Horning EC, Horning MG. Human metabolic profiles obtained by GC and GC/MS. *Journal of Chromatographic Science*. 1971a;9:129-40.
24. Horning EC, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clinical Chemistry*. 1971b;17:802-9.
25. Gates SC, Sweeley CC. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clinical Chemistry*. 1978;24(10):1663-73.
26. Bartle KD, Myers P. History of gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 2002;21:547-57.
27. Nishiumi S, Kobayashi T, Ikeda A, Yoshie T, Kibi M, Izumi Y, Okuno T, Hayashi N, Kawano S, Takenawa T, Azuma T, Yoshida M. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7:e40459.
28. Tinke AP, van der Hoeven RAM, Niessen WMA, Tjaden UR, van der Greef J. Some aspects of peak broadening in particle-beam liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1991;554:119-24.
29. M'Koma AE, Blum DL, Norris JL, Koyama T, Billheimer D, Motley S, Ghiassi M, Ferdowsi N, Bhowmick I, Chang SS, Fowke JH, Caprioli RM, Bhowmick NA. Detection of pre-neoplastic and neoplastic prostate disease by MALDI profiling of urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;353:829-34.
30. Bertram HC, Eggers N, Eller N. Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification. *Analytical Chemistry*. 2009;81:9188-93.

31. Chassy BM. Can-omics inform a food safety assessment? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010;58:S62-70.
32. Doerrer N, Ladics G, McClain S, Herouet-Guicheney C, Poulsen LK, Privalle L, Stagg N. Evaluating biological variation in non-transgenic crops: executive summary from the ILSI Health and Environmental Sciences Institute workshop, November 16-17, 2009, Paris, France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010;58:S2-7.
33. Madsen R, Lundstedt T, Trygg T. Chemometrics in metabolomics – A review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*. 2010;659:23-33.
34. Kind T, Tolstikov V, Fiehn O, Weiss RH. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. *Analytical Biochemistry*. 2007;363:185-95.
35. Gomez-Casati DF, Zanol MI, Busi MV. Metabolomics in plants and humans: applications in the prevention and diagnosis of diseases. *BioMedical Research International*. 2013;Article ID 792527.
36. Kawakami M, Kobayashi A. Volatile constituents of green mate and roasted mate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991;39:1275-9.
37. Choi YH, Kim HK, Hazekamp A, Erkelens C, Lefeber AWM, Verpoorte R. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Journal of Natural Products*. 2004;67:953-7.
38. Yuliana ND, Khatib A, Choi YH, Verpoorte R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research*. 2011;25:157-69.
39. Davies HV, Shepherd LVT, Stewart D, Frank T, Röhlig RM, Engel KH. Metabolome variability in crop plant species – When, where, how much and so what? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010;58:S54-61.
40. Kuhn S, Ogliari JB, Dias PF, Santos MS, Ferreira AG, Bonham CC, Wood KV, Maraschin M. Metabolic fingerprint of Brazilian maize landraces silk (stigma/styles) using NMR spectroscopy and chemometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010a;58:2194-200.
41. Kuhn S, Ogliari JB, Dias PF, Boffo EF, Correia I, Ferreira AG, Delgadillo I, Maraschin M. ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. *International Journal of Food Science & Technology*. 2010b;45:1673-81.
42. Marcucci MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*. 1996;19:529-36.
43. Fontana JD, Adelman J, Passos M, Maraschin M, Lacerda CA, Lanças FM. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. *Methods in Biotechnology*. 2004;16:203-18.
44. Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino FRA. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*. 2002;25:321-6.
45. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73:S1-6.

46. Woisky RG, Giesbrecht AM, Salatino A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*. 1994;30:19-21.
47. Lustosa SR. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18:447-54.
48. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2005;2:33-8.
49. Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World*. 1979;12:59-84.
50. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100:114-77.
51. Souza EA, Inoue HT, Gomes SMA, Funari SRC, Orsi RO. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. *Archivos de Zootecnia*. 2010;59:210-4.
52. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50:2502-6.
53. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*. 2006;45:141-8.
54. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Rehder VG, Sartorato A, Ikegami M, Bowen WH, Koo H. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Caries Research*. 2005;39:328-9.
55. Marcucci MC. Própolis tipificada: um novo caminho à elaboração de medicamentos de origem natural contendo este produto apícola. *Revista Fitos*. 2006;1:36-46.
56. Bankova V, Marcucci MC, Simova S, Nikolova N, Kujumgiev A, Popov S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. 1996;50:277-80.
57. Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and anti-bacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. 1995;50:167-72.
58. Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki I, Kadota S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*. 1998;7:896-900.
59. Alencar SM, Aguiar CL, Paredes-Guzmán J, Park YK. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*. 2005;35:909-15.
60. Soares AKA, Carmo GC, Quental DP, Nascimento DF, Bezerra FAF, Moraes MO, Moraes MEA. Clinical safety evaluation of a phytomedicine containing *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium*

- officinale, honey and propolis in healthy volunteers. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006;16:447-54.
61. Tavares JP, Martins IL, Vieira AS, Lima FAV, Bezerra FAF, Moraes MO, Moraes MEA. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006;16:350-6.
62. Bankova V. Chemical diversity of propolis is a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProducts and ApiMedical Science*. 2009;1:23-8.
63. Grundberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cell by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 1988;44:230-2.
64. Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Dominguez Z, Robles R, Robles-Zepeda R, Lugo E, Goycoolea FM, Velazquez EF, Astiazaran H, Hernandez J. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103:1747-56.
65. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature Review Drug Discovery*. 2005;4:236-48.
66. Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Damyanova B, Sabatini AG, Marcuzzan GL, Bogdanov S. Poplar type propolis and analysis of its biologically active components. *Honeybee Science*. 2003;24:61-6.
67. Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Nikolova-Damyanova B, Sabatini AG, Marcuzzan GL, Bogdanov S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*. 2004;15:235-40.
68. Boudorova-Kravsteva G, Bankova V, Sforcin JM, Nikolova N, Popov S. Phenolics from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1997;52:676-9.
69. Marcucci MC, Ferreres F, Custodio AR, Ferreira MM, Bankova VS, Garcia-Viguera C, Bretz WA. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2000;55:76-81.
70. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Science*. 2000;21:85-90.
71. Bankova V, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000;31:3-15.
72. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, Castro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;74:105-12.
73. Watson DG, Peyfoon E, Zheng L, Lu D, Seidel V, Johnston B, Parkinson JA, Fearnley J. Application of principal components analysis to ¹H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochemical Analysis*. 2006;17:323-31.
74. Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Fernandez MC, Hernandez IM, Rosado A, Rastrelli L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR:

the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55:7502-9.

75. Maraschin M, Somensi-Zeggio A, Oliveira SK, Kuhnen S, Tomazzoli MM, Zeri ACM, Carreira R, Rocha M. A machine learning and chemometrics assisted interpretation of spectroscopic data – A NMR-based metabolomics platform for the assessment of Brazilian propolis. *Lecture Notes in Computer Science*. 2012;7632:129-40.

76. Papotti G, Bertelli D, Plessi M, Rossi MC. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. *International Journal of Food Science and Technology*. 2010;45:1610-8.

77. Maraschin RP, Ianssen C, Ogliari JB, Dias PF, Maraschin M, Cimadon AMA, Zanús C, Caro MSB. Flash-chromatography and ¹H-NMR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon wines – a chemical composition similarity study. *Annals of Magnetic Resonance*. 2003;2:48-51.

78. Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*. 2010;5:536-49.

79. Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:W652-60.

80. Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*. 1901;2:559-72.

81. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing; 2013 [Internet]. [Cited 2016 August 11]. Available from: <http://www.R-project.org>.

82. Johnson SC. Hierarchical clustering schemes. *Psychometrika*. 1967;32(3):241-54.

83. Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*. 2003;17:166-73.

84. Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, van Velzen EJJ, van Duijnhoven JPM, van Dorsten FA. Assessment of PLSDA cross-validation. *Metabolomics*. 2008;4:81-9.

85. van den Berg RA, Hoefsloot HC, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. 2006;7:142-7.

86. Witten H, Frank E, Hall MA. Data Mining – Practical Machine Learning Tools and Techniques. 3rd ed. San Francisco: Morgan Kaufman; 2011.

87. Weljie A, Newton J, Mercier P, Carlson E, Slupsky C. Targeted profiling: quantitative analysis of ¹H-NMR metabolomics data. *Analytical Chemistry*. 2006;78:4430-42.

IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PURAS OU EM FORMULAÇÕES POR MEIO DE ANÁLISE ESPECTRAL E QUIMIOMETRIA

Cristina M. Quintella
Marilena Meira
Edna Maura P. de Araújo
Juceni P. David
Alessandra dos S. Tanajura
Humbervânia R. G. da Silva
Alexandre K. Guimarães
Weidson L. Silva e Rodolfo R. Guarín

2.1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias puras ou em formulações para diversos fins, sejam extraídas de plantas e animais, sejam sintetizadas, é tão antigo quanto o próprio homem e tem servido de base para o desenvolvimento de diversos setores industriais.

Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, o interesse pelas drogas de origem vegetal permanece e, atualmente, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 44% de todas as novas drogas têm envolvimento de produtos naturais. Por exemplo, de acordo com Hostettmann (2003), dos medicamentos prescritos, 56% são produtos sintéticos, 24% são derivados de produtos naturais, 9% são produtos sintéticos modelados a partir de produtos naturais, 6% são produtos naturais e 5% biológicos¹.

A adulteração de um produto, seja ele alimentar, farmacêutico, combustível ou outro, inclui a substituição do produto original por um similar mais barato. Por exemplo, no caso de um medicamento, inclui a substituição do princípio ativo mais caro por placebos, tal como ocorreu no episódio da “pílula de farinha”, em que houve a substituição do princípio ativo da pílula anticoncepcional por farinha. A adulteração pode se dar também pela redução da quantidade do princípio ativo, o que pode diminuir o efeito do medicamento, provocar o retardo do tratamento ou a morte de pessoas com problemas crônicos tratadas com remédios falsificados².

No caso de alimentos, um exemplo frequente de adulteração é a do azeite de oliva, que muitas vezes é adulterado com azeites de oliva de menor qualidade ou com outros óleos comestíveis, como de soja, milho, canola, algodão, girassol, amendoim e amêndoa.

Adulterações de combustíveis ocorrem por adição de produtos mais baratos e que possuem boa miscibilidade no diesel, tais como óleos vegetais resultantes de fritura (não transesterificado) ou solventes, como querosene ou aguarrás. Combustíveis adulterados provocam aquecimento e aceleração do motor, além de aumentarem o consumo de combustível, a emissão de material particulado e de gases de exaustão³.

Na análise química de materiais, substâncias puras ou em formulações, as principais técnicas utilizadas são as técnicas espectroscópicas, nas quais os dados físico-químicos são levantados através da transmissão, absorção ou reflexão da energia de radiação incidente em uma amostra. Fazem parte das técnicas espectroscópicas a espectrometria de massas (EM), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), no infravermelho (IV), no UV/Visível e de fluorescência, bem como a rotação óptica específica, $[\alpha]_D$, dicroísmo circular (CD) e cristalografia de raios X, entre outras².

A identificação de substâncias por RMN, principalmente de ^1H e de ^{13}C , é uma das técnicas mais usadas para se obter informações sobre a estrutura química de compostos orgânicos conhecidos ou não. O espectro RMN ^1H é facilmente obtido, pois os núcleos de hidrogênio são abundantes e a análise

pode ser realizada em cerca de dez minutos. No entanto, a técnica de RMN ^{13}C pode exigir um tempo de medida tão grande quanto 24 horas, devido à baixa sensibilidade inerente do núcleo de ^{13}C (1,59% relativa ao ^1H) e, normalmente, a pouca quantidade de amostra disponível, frequentemente menor que 20 mg.

Além desses espectros rotineiros, muitas vezes faz-se necessário usar técnicas para obtenção de espectros em duas dimensões (2D), tais como *homonuclear correlation spectroscopy* (COSY, correlações entre hidrogênios que estão acoplados por 2-3 ligações – $J_{\text{H,H}}$), *nuclear overhauser effect spectroscopy*, (NOESY, correlação entre hidrogênios espacialmente próximos), *heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy* (HMQC/HMBC) e *heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy* (HSQC), dentre outras técnicas, para elucidar as estruturas das substâncias. Todas essas técnicas têm custo elevado, além de serem demoradas⁴.

O desenvolvimento de métodos cromatográficos, tais como o *high-performance liquid chromatography* (HPLC), para identificação de substâncias puras, medicamentos ou drogas ilícitas, além de demorar, envolve custos adicionais com solventes e problemas ambientais relacionados com a disposição de grande volume de solvente residual².

Tratando-se de substâncias desconhecidas, é imprescindível, para a determinação de suas estruturas, a utilização de técnicas avançadas e a análise integrada dos vários espectros obtidos. Entretanto, a situação mais corriqueira é a análise de substâncias com estruturas já conhecidas. Ainda assim, na maioria dos casos, a confirmação das estruturas é feita utilizando várias técnicas sofisticadas, o que resulta em gastos desnecessários de tempo e elevação dos custos⁴.

A necessidade de economicidade de tempo e aumento da eficiência indicou a conveniência de desenvolver um método para a confirmação da identidade das substâncias já conhecidas, que agregasse os requisitos de alta sensibilidade, simplicidade, baixo custo e rapidez. O método aqui descrito consiste na identificação de substâncias aromáticas por comparação de seus espectros obtidos por espectrofluorimetria e espectroscopia no UV-Vis com os espectros correspondentes de substâncias padrões e análise destes através de métodos quimiométricos, tais como a análise de componentes principais (PCA). Além disso, também é possível quantificar essas substâncias através de técnicas de calibração multivariada, como, por exemplo, mínimos quadrados parciais (PLS)⁴.

O método também pode ser aplicado com sucesso na identificação de adulteração do diesel por óleo residual por comparação de seus espectros

obtidos por Espectrofluorimetria com os espectros correspondentes de misturas preparadas e a análise destes espectros através da análise de componentes principais (PCA)². A aplicação da espectrofluorimetria associada à técnica de calibração multivariada, como, por exemplo, mínimos quadrados parciais (PLS), permite a determinação de importantes propriedades de biocombustíveis, como estabilidade oxidativa⁵, viscosidade, massa específica e concentração⁶.

2.2 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE MÉTODOS DE ANÁLISE ESPECTROSCÓPICOS

A prospecção tecnológica é uma ferramenta essencial para que se possam decidir os rumos da pesquisa, do desenvolvimento tecnológico e da inovação de base tecnológica⁷⁻⁹ como, por exemplo, em associações como a RENORBIO, que focam o desenvolvimento de biotecnologia¹⁰, ou em estratégias de desenvolvimento regional¹¹.

Recentemente, algumas prospecções tecnológicas mostraram aspectos específicos da identificação de óleos vegetais e combustíveis de substâncias puras ou em formulações mapeando patentes e artigos, tais como uso da fluorescência da clorofila para determinar adulteração de óleos vegetais¹², análise da matéria-prima para produção de biodiesel¹³, avaliação da qualidade de óleos por fluorescência¹⁴, determinação do grau de oxidação de óleos e biocombustíveis por métodos óticos¹⁵, monitoramento do processo de transesterificação básica com ênfase em produção de biodiesel¹⁶.

2.2.1 Metodologia da prospecção

A metodologia foi desenvolvida especificamente para se analisar a evolução dos métodos analíticos baseados em propriedades óticas para determinação da qualidade de combustíveis, óleos e misturas. Foi utilizado o banco eletrônico Espacenet, do European Patent Office (EPO)*, que atualiza periodicamente a sua base, incluindo patentes depositadas em mais de 90 países, tendo boa cobertura e menos repetições que outras bases, além de permitir o livre acesso.

* Disponível em <http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html>.

Foi utilizada a classificação europeia (*European classification system – ECLA*), por ser um sistema de classificação internacional mais detalhado e preciso, com menos repetições e melhor cobertura.

Os códigos (Tabela 2.1) foram selecionados privilegiando a especificidade e pertinência para o tema.

Foram considerados todos os pedidos de patentes, independentemente de seu exame e concessão, dado que o objetivo é avaliar o que a humanidade tem apropriado e desenvolvido nesse tema. Dessa forma, o propósito foi encontrar gargalos e oportunidades nas análises com métodos espectroscópicos para determinação da qualidade de combustíveis, óleos e misturas.

Foram identificadas 1.129 solicitações de patentes relacionadas ao tema, todas baixadas e organizadas em uma planilha do programa Excel e depois importadas pelo *software* de mineração de textos Vantage Point, sendo, em seguida, processadas.

Tabela 2.1 Principais códigos de classificação obtidos na revisão sistemática de patentes

| CÓDIGOS | DESCRIÇÃO |
|-----------|---|
| G02B6/00 | Guias de luz; detalhes estruturais de disposições, incluindo guias de luz e outros elementos óticos, p. ex., acoplamentos. |
| G02B6/43 | Acoplamentos de guias de luz com combinações compreendendo vários elementos optoeletrônicos e interconexões óticas associadas (dispositivos semicondutores emissores de luz ou sensíveis à luz; <i>lasers</i> semicondutores monoliticamente integrados com outros componentes). |
| G01J3/08 | Espectrometria; espectrofotometria; monocromadores; medição das cores em sistemas para comutação do feixe. |
| G01J3/42 | Investigação do espectro (usando filtros de cor) aplicando técnicas analíticas de: espectrometria de absorção; espectrometria por raios duplos; espectrometria por cintilação; espectrometria por reflexão (disposições para a interrupção de raios). |
| G01N21/00 | Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos, p. ex., usando raios infravermelhos, visíveis ou ultravioletas. |
| G01N21/17 | Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos em sistemas, nos quais a luz incidente é modificada em concordância com as propriedades do material investigado (nas quais o material investigado é óticamente excitado, provocando uma modificação no comprimento de onda da luz incidente). |
| G01N21/39 | Investigação das propriedades óticas (cor; propriedades espectrais) do material com relação a comprimentos de ondas característicos de elementos ou moléculas específicas, p. ex., espectrometria de absorção atômica usando <i>lasers</i> sintonizáveis. |
| G01N21/41 | Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos, em sistemas nos quais a luz incidente é modificada em concordância com as propriedades do material investigado pela refatividade e propriedades que afetam as fases. |

| CÓDIGOS | DESCRIÇÃO |
|-----------|---|
| G01N21/62 | Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos em sistemas nos quais o material investigado é excitado, de modo que ele emita luz ou faça com que ocorra uma modificação no comprimento de onda da luz incidente. |
| G01N21/63 | Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos em sistemas nos quais o material investigado é excitado, de modo que ele emita luz ou faça com que ocorra uma modificação no comprimento de onda da luz incidente, óticamente excitados. |
| G01N21/64 | Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos em sistemas nos quais o material investigado é excitado, de modo que ele emita luz ou faça com que ocorra uma modificação no comprimento de onda da luz incidente, óticamente excitados. Fluorescência; fosforescência. |
| C10L1 | Combustíveis carbonáceos líquidos |
| G01N33/00 | Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N1/00-G01N31/00. |
| G01N33/03 | Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N1/00-G01N31/00 de óleos ou gorduras comestíveis |
| G01N33/18 | Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N1/00-G01N31/00 de água. |
| G01N33/28 | Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N1/00-G01N31/00 de óleos. |
| G01N33/52 | Investigação ou análise de materiais por métodos específicos e análise química de material biológico com a utilização de compostos ou composições para investigação colorimétrica, espectrofotométrica ou fluorométrica. |

Foram examinadas e retiradas as patentes repetidas, duplicidades e patentes pertencentes à mesma família obtidas mais de uma vez, devido aos depósitos independentes em diferentes instituições de propriedade industrial. Com este pré-tratamento, restaram 309 patentes de interesse para o controle da qualidade de combustíveis, óleos e misturas.

Avaliaram-se em cada patente, aspectos relacionados ao depósito de patentes (evolução anual, país e continente), depositantes (setor, organização, empresa, independente, instituição de pesquisa, governo), tipo da patente (método, aparato, processo, produto), método e/ou técnicas empregadas, componentes e fluidos de análises. Na análise estatística das patentes, utilizaram-se lineamentos e indicadores de reporte de desempenho, segundo os conceitos da World Intellectual Property Organization (WIPO, 2013):

- A construção de indicadores foi realizada a partir da data de depósito da patente; dessa forma, as patentes protocoladas 18 meses antes da pesquisa foram incluídas.

- Os dados de famílias de patentes foram baseados em data de prioridades (primeiro depósito).
- O país de origem foi estabelecido em relação ao país de residência do primeiro depositante.
- No caso de empresas com depósitos em vários países ou subsidiárias, os resultados das estatísticas por depositante foram somados e apresentados sob um único titular.

A estratégia da revisão sistemática de artigos científicos consistiu inicialmente na definição e classificação das palavras-chave mais pertinentes para realizar o mapeamento tecnológico e revisão sistemática de artigos relacionados a sensores espectrofluorimétricos e/ou meios óticos para controle da qualidade de combustíveis, óleos e misturas (Tabela 2.2).

A classificação dos artigos se deu em relação à invenção e/ou aperfeiçoamento de equipamentos (sensores), aos métodos empregados (infravermelho, absorção UV, fluorescência e espectrofluorimetria), materiais (combustíveis, óleos, diesel, biodiesel e biocombustíveis) e aplicações das tecnologias em função de analisar as propriedades para o controle da qualidade de combustíveis, óleos e misturas (adulteração, concentração, mistura, qualidade, determinação, detecção, mensuração, monitoramento e/ou identificação).

Tabela 2.2 Classificação das palavras-chave utilizadas na busca de artigos científicos

| | | | |
|---------------------|---------------|-------------------|-------------|
| EQUIPAMENTOS | Sensor* | APLICAÇÕES | Adulter* |
| MÉTODOS | Infrared* | | Concentra* |
| | UV Absorpt* | | Mixtur* |
| | Fluoresc* | | Qualit* |
| | Spectrofluor* | | Determinat* |
| ÓLEOS | Fuel* | | Detect* |
| | Oil* | | Measurem* |
| | Diesel* | | Monitor* |
| | Biodiesel* | | Identific* |
| | Biofuel* | | |

* Indica que qualquer substituição é possível.

Nessa fase preliminar, foi observada uma elevada generalidade do campo tecnológico associada às palavras-chave selecionadas acima, ou

seja, encontrou-se uma extensa quantidade de registros de artigos científicos publicados por cada palavra-chave. Para evitar generalidades que não incluíssem artigos de interesse, o que tornaria o volume de informação operacionalmente inviável para a triagem, processamento e análise, realizou-se a combinação dessas palavras-chave, em função das suas classificações (equipamentos, métodos, óleos, aplicações), conforme a Tabela 2.3, excluindo aplicações médicas, microbiológicas e animais.

Tabela 2.3 Busca de artigos com combinações de palavras-chave no campo “tópico”

| CAMPO | LÓGICA | PALAVRAS-CHAVE |
|-------|--------|------------------------------|
| 1 | — | Equipamento (Sensor*) |
| 2 | AND | Métodos (Spectrofluor*) |
| 3 | AND | Materiais (Biodiese*) |
| 4 | AND | Aplicações (Adulter*) |
| 5 | NOT | Medic* or Microb* or animal* |

* Indica que qualquer substituição é possível.

Foram selecionados e exportados 4.225 artigos da base Web of Science, da ISI Web of Knowledge*. Foram examinados e retirados os artigos em duplicidade, restando 1.764 artigos de interesse.

Avaliaram-se em cada artigo aspectos relacionados à publicação (evolução anual, país e continente), às organizações (setor, empresa, independente, instituição de pesquisa, governo), ao tipo de artigo (método, aparato, processo, produto), método e/ou técnicas empregadas, componentes e fluidos de análises.

2.2.2 Resultados da prospecção

Até 1990, foram publicados sete artigos sobre o tema e solicitadas 86 patentes que se referiam essencialmente a métodos tradicionais, cujos equipamentos já se encontram em uso em escala comercial há décadas. A partir de 1990, (Figura 2.1) são identificadas duas ondas tecnológicas: uma inicial, referente a melhorias de tipos de amostras e a *lasers*; e outra mais recente, referente a novos materiais e componentes, como LEDs e fotodiodos.

* Ver <http://www.webofknowledge.com>.

Quanto aos sete artigos publicados até 1990, foram selecionados apenas aqueles que propõem o desenvolvimento de novas técnicas ou novas metodologias, excluindo os que focavam, essencialmente, no uso dos métodos tradicionais, por isso a sua contagem. A partir de 1990, o crescimento dos artigos é exponencial, sendo vários os métodos propostos e diversos os equipamentos descritos para operar com esses métodos.

A razão entre patentes e artigos mostra pouca estabilidade, típica de tecnologias que eram maduras e que estão apresentando vertentes tecnológicas emergentes. De fato, várias técnicas espectroscópicas estão sofrendo melhorias ou mudando radicalmente o tipo de componentes dos equipamentos, ou ainda sendo integradas e focando em portabilidade, uso em tempo real, técnicas não invasivas e não destrutivas.

Os vários métodos e as relações entre eles foram analisadas, tanto para patentes (Figura 2.2) como para artigos (Figura 2.3).

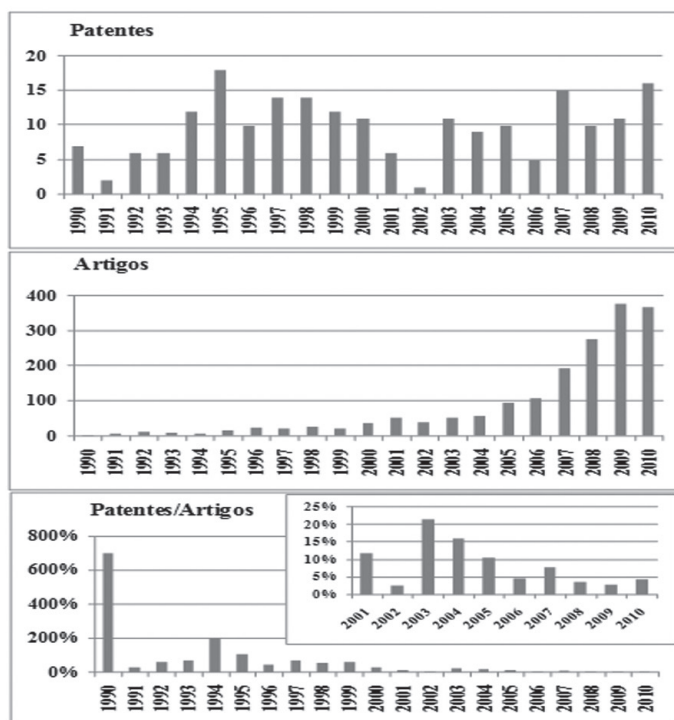


Figura 2.1 Evolução anual desde 1990 das solicitações de patentes, das publicações de artigos e da razão percentual anual entre elas.

Os métodos mais referidos nas patentes são fluorescência, absorção, infravermelho, marcadores em geral, refletância e colorimetria, sendo observada também a cromatografia. São observadas muitas patentes em associações com fluorescência e absorção, e em absorção com infravermelho. Associações de três técnicas mostram, principalmente fluorescência com marcadores e absorção. Uma patente associa colorimetria com cromatografia e marcadores. Aqui se identifica uma oportunidade em métodos de fluorescência que não estejam associados a marcadores, ou seja, que utilizem a fluorescência intrínseca das amostras.

Exemplos de patentes pertinentes ao nosso tema são poucos e ocorreram há algumas décadas, como, por exemplo, a da empresa Conoco Inc. (1980), referente a um método utilizando fluorescência para determinação da presença de hidrocarbonetos em água. Ou o exemplo da empresa Baileys Meters Controls Ltda (1977), referente a um processo e um equipamento para monitoramento por fluorescência de poluição ambiental^{17,18}.

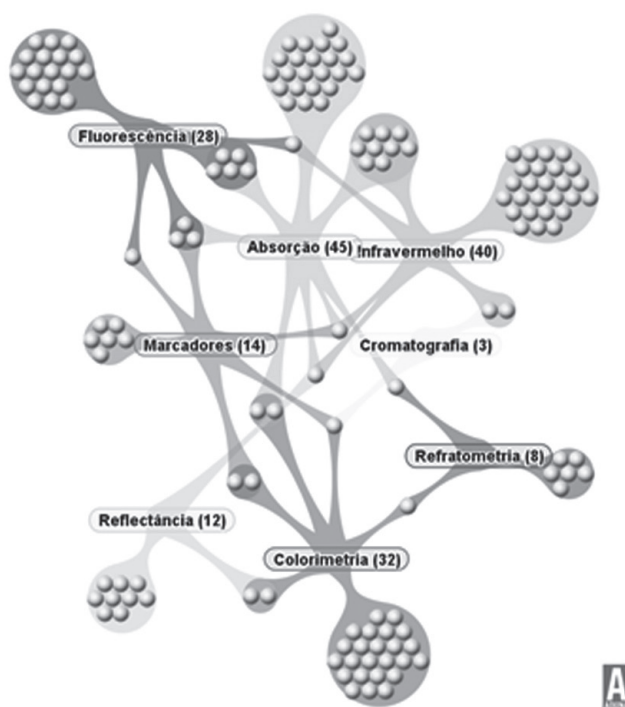


Figura 2.2 Rede de relacionamento entre patentes no que tange a tipos de técnicas (cada bolinha representa um documento).

Os artigos focam essencialmente fluorescência, infravermelho, cromatografia, absorção e marcadores, tendo ainda uma pequena contribuição de refletância e colorimetria. Ora, como os artigos são indicadores de para onde a ciência está se dirigindo e são os precursores das patentes, pode-se considerar que as tecnologias de refletância e de marcadores estão se tornando maduras, sem grandes descobertas científicas que levariam a novas patentes.

Por exemplo, Wang et al. (2009) analisaram óleos através de fluorescência, estudando os efeitos substituintes e solventes de derivados de benzotiazol¹⁹. Changchuan et al. (2010) usaram luminescência e polarização da fluorescência para determinar a presença de traços de europium (III) em óleos e sistemas micelares em terras raras²⁰. Sahiner et al. (2007) monitoraram *in situ* a síntese de micro e nanogéis a partir de derivados de acrilamida num sistema organogel de lecitina de soja²¹. Januszewicz et al. (1992) utilizaram traçadores fluorescentes no ultravioleta para monitorar a contaminação de óleos²⁰. Xu et al. (2008) determinaram a presença de antraceno

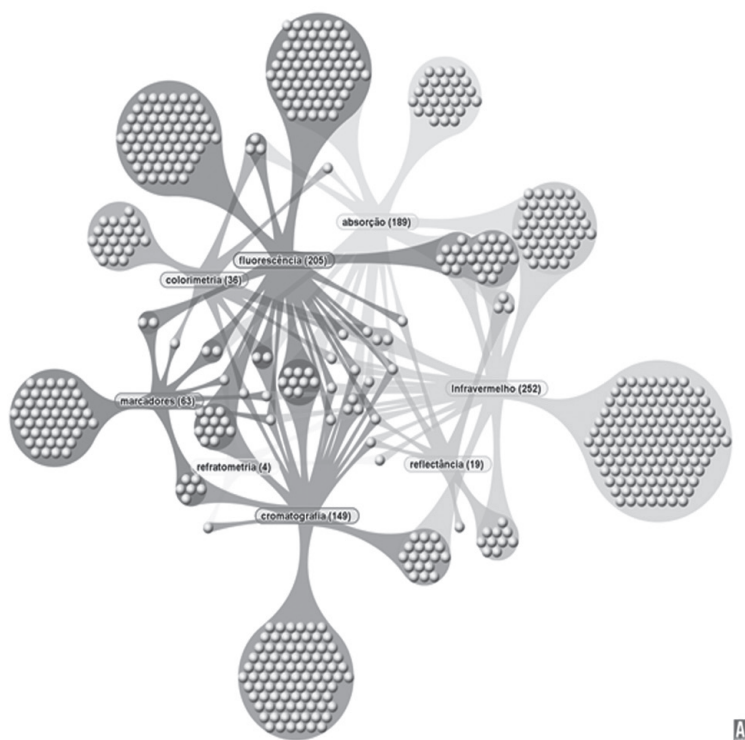


Figura 2.3 Rede de relacionamento entre artigos no que tange a tipos de técnicas.

em microemulsões SDS/álcool benzílico/água, mostrando que este tende a se localizar na membrana da interface e na fase oleosa²³.

É grande a associação entre absorção e fluorescência nos artigos, indicando uma tendência da ciência de ter as duas técnicas num mesmo método de análise de qualidade. As publicações de artigos com associações das palavras-chave “infravermelho e absorção” e “fluorescência, infravermelho e refletância” são numerosas, o que pode ser atribuído, especialmente, à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* – FTIR) e a espectroscopia no infravermelho próximo (*near infrared* – NIR).

Em cada documento de depósito de patentes foram mapeados os usos das técnicas de análise (Figura 2.4). A maioria delas se refere às características de compostos, sendo predominantes os hidrocarbonetos e os óleos. As aplicações em saúde de novas técnicas são também bastante referidas. São ainda relativamente poucos os documentos de patentes referentes a analitos

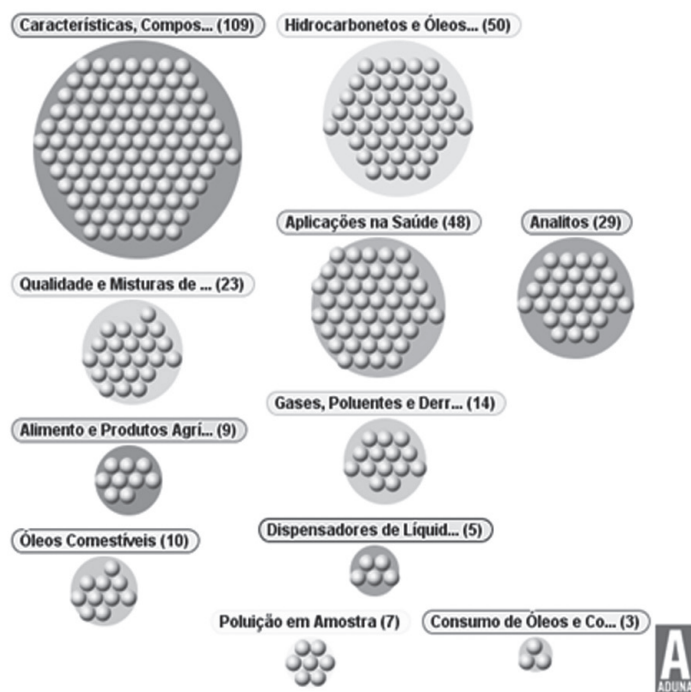


Figura 2.4 Distribuição por temas das patentes envolvendo métodos óticos de análise.

e qualidade de misturas, mostrando que ainda vale a pena investir em pesquisa e desenvolvimento neste tema. Estão também presentes alimentos, óleos comestíveis, consumo de óleos e produtos agrícolas, aspectos ambientais como gases poluentes, derramamentos e detecção de grau de poluição em amostras.

Exemplos de usos de patentes são o uso da espectroscopia de absorção no UV-vis para determinar propriedades de óleos e sua presença ou contaminação²⁴, da quimioluminescência para detectar contaminações de superfícies por micro-organismos²⁵ e para determinar o teor de óleo em sementes²⁶, da espectroscopia de absorção e reflexão para determinar o nível de estresse oxidativo utilizando os ácidos graxos de um tecido²⁷ e da fluorescência intrínseca para monitorar qualidade em processos de obtenção de combustíveis e dispositivo sensor para sua operação²⁸, para identificação de substâncias, puras ou em formulações, através de análise espectral e quimiometria² e método para prever propriedades químicas e físico-químicas de óleos através de análise multivariada associada com espectrofluorimetria²⁹.

Observou-se que a técnica de espectrofluorimetria a LED associada à quimiometria é uma oportunidade, tendo em vista o desenvolvimento de componentes nas últimas décadas que permitem desenvolver equipamentos de baixo custo, portáteis e com boa relação sinal/ruído.

2.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Métodos que se baseiam na detecção e análise de um feixe de radiação eletromagnética vinda de uma amostra que está sob investigação são denominados espectroscópicos. São métodos que determinam a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria, fundamentados na absorção ou emissão de radiação eletromagnética por muitas moléculas, quando seus elétrons movimentam-se entre níveis energéticos. Diferentes intervalos no amplo espectro da radiação eletromagnética, desde os raios X até micro-ondas, são cobertos pelos diferentes métodos ditos espectroscópicos. Considerando que as interações da radiação com a matéria podem ocorrer tanto em nível atômico como em nível molecular, os métodos instrumentais espectroscópicos compreendem (Tabela 2.4) emissão (emissão atômica), luminescência (fluorescência atômica e molecular, fosforescência), espalhamento (Raman, turbidimetria e nefelometria) e absorção (absorção atômica e molecular)⁴.

O espectro de radiações eletromagnéticas estende-se, em ordem crescente de energia, das ondas de rádio, com longos comprimentos de onda (de 10^3 m a 100 m), até radiações de altíssima energia (raios X e raios gama) com comprimentos de onda muito curtos, entre 10^{-10} m e 10^{-15} m. O espectro inclui também regiões de radiações com energias intermediárias, entre micro-ondas e o ultravioleta de vácuo. Cada uma dessas regiões tem suas formas próprias de serem produzidas e detectadas, e não existe uma interface perfeitamente definida entre regiões adjacentes, sendo o espectro contínuo do ponto de vista macroscópico³⁰.

Tabela 2.4 Faixa de comprimento de onda de cada técnica espectroscópica

| TIPO DE ESPECTROSCOPIA | FAIXA DE COMPRIMENTO DE ONDA USUAL | FAIXA DE NÚMERO DE ONDA USUAL CM-1 | TIPO DE TRANSIÇÃO QUÂNTICA |
|--|------------------------------------|-------------------------------------|---|
| Emissão de raios gama | 0,005 Å a 1,4 Å | – | Nuclear |
| Absorção, emissão, fluorescência e difração de raios X | 0,1 Å a 100 Å | – | Elétrons internos |
| Absorção no ultravioleta a vácuo | 10 nm a 180 nm | 1×10^6 a 5×10^4 | Elétrons ligados |
| Absorção, emissão e fluorescência no UV/visível | 180 nm a 780 nm | 5×10^4 a $1,3 \times 10^4$ | Elétrons ligados |
| Absorção no IV e espalhamento Raman | 0,78 µm a 300 µm | $1,3 \times 10^4$ a 33 | Rotação/vibração de moléculas |
| Absorção de micro-ondas | 0,75 mm a 375 mm | 13 a 0,03 | Rotação de moléculas |
| Ressonância de <i>spin</i> eletrônico | 3 cm | 0,33 | <i>Spin</i> de elétrons em um campo magnético |
| Ressonância magnética nuclear | 0,6 m a 10 m | $1,7 \times 10^2$ a 1×10^3 | <i>Spin</i> de núcleos em um campo magnético |

2.3.1 Espectrofluorimetria

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética na região do ultravioleta próximo-visível, por moléculas que foram excitadas e retornaram ao seu estado fundamental. A luminescência se divide em fluorescência e fosforescência, que diferem pela natureza do estado excitado envolvido. Na fluorescência, o *spin* do elétron excitado mantém sua orientação original, sendo denominado estado excitado singlete, no qual o intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia captada é extremamente curto ($<10^{-5}$ s, podendo ser de até 10^{-12} s) (Figura 2.5)³¹.

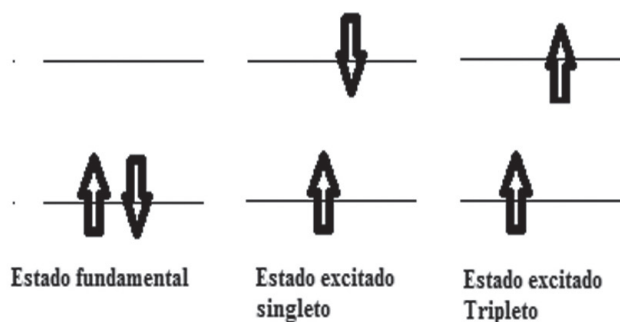


Figura 2.5 Representação do estado fundamental e dos estados excitados singlete (fluorescência) e tripleto (fosforescência).

Quando, durante a promoção do elétron ao estado excitado, ocorre inversão do *spin* eletrônico, o intervalo de tempo entre a captação e a emissão de energia é bem maior (de alguns segundos ou até mais), sendo o fenômeno chamado de fosforescência (Figura 2.5)³¹.

A espectrofluorimetria é uma técnica analítica que possui grande sensibilidade, e, por isso, tem sido amplamente aplicada para analitos que requerem baixos limites de detecção³²⁻³⁵. A sensibilidade da espectrofluorimetria é consideravelmente maior que da espectrofotometria UV/visível, apresentando limites de detecção de até três ordens de grandeza menores, geralmente na faixa de ng.mL^{-1} , em função do baixo sinal de fundo que as medidas fluorescentes apresentam³⁶.

Outra vantagem importante da espectrofluorimetria é a maior seletividade, o que pode ser explicado considerando que substâncias fluorescentes são menos comuns do que substâncias não fluorescentes. Dessa forma, as

substâncias fluorescentes apresentam espectros característicos de excitação e/ou emissão. A sensibilidade, seletividade e, adicionalmente, a simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e de análise, quando comparados com os de outros métodos analíticos, fazem da espectrofluorimetria uma poderosa técnica com amplo uso na análise de diversos princípios ativos de uso farmacêutico, biológico, ambiental e industrial³⁷⁻³⁹.

A limitação da espectrofluorimetria é que somente certas classes de substâncias exibem luminescência intrínseca, como consequência dos processos de desativação que ocorrem em uma molécula. No entanto, é muitas vezes possível a derivatização de analitos não fluorescentes em compostos fluorescentes ou a detecção indireta através da fluorescência de compostos que reagem quantitativamente com o analito^{19,40-44}.

O equipamento utilizado para medir a fluorescência é o espectrofluorímetro (Figura 2.6). A maioria dos espectrofluorímetros opera no visível,

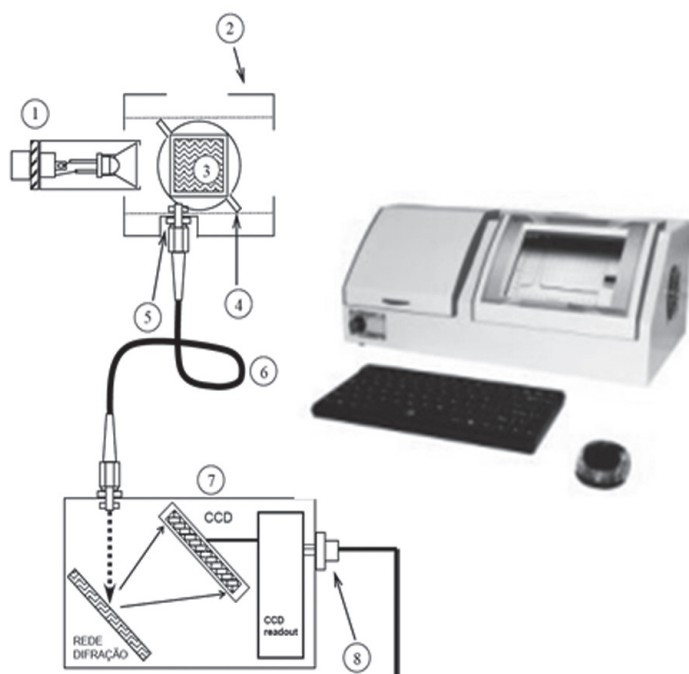


Figura 2.6 Equipamento do espectrofluorímetro Q798FILL: 1) fonte de radiação (LED); 2) bloqueio de entrada de luz; 3) amostra; 4) ajuste da amostra; 5) detector (fotodiodo); 6) fibra ótica; 7) separador de comprimentos de onda da fluorescência⁴⁵⁻⁴⁶.

estendendo-se um pouco para o infravermelho e para o ultravioleta. Um espectrofluorímetro compreende: (a) uma fonte de radiação com comprimentos de onda conhecidos, que pode ser uma lâmpada associada a um monocromador ou pode ser um arranjo de LEDs; (b) um sistema de transferência da radiação emitida até a amostra, que pode ser de fibra ótica ou um percurso envolvido por proteção para impedir a entrada de outra radiação; (c) um suporte de amostra sobre o qual a luz incide; (d) um sistema de coleta da radiação emitida pela amostra, que pode ser de fibra ótica e/ou sistema de lentes ou espelhos; (e) um sistema de detecção que pode ser de fotodiodos, por exemplo.

Nos equipamentos tradicionais, utilizam-se monocromadores para isolar uma linha de comprimento de onda (λ) oriunda da fonte de radiação policromática. Um monocromador é composto por um arranjo ótico que, através de uma grade de difração, decompõe em diferentes comprimentos de onda uma fonte de luz policromática incidente. Nos modernos, se utilizam LEDs de excitação monocromática no comprimento de onda de interesse. Nos equipamentos tradicionais, a radiação emitida é separada em comprimentos de onda por um monocromador e detectada em cada comprimento de onda por uma fotomultiplicadora. Nos dispositivos modernos se utilizam dispositivos eletrônicos que separam a radiação em seus comprimentos de onda, e a radiação é detectada integralmente e ao mesmo tempo por fotodiodos ou por arranjos de sensores.

Os espectrofluorímetros desenvolvidos no meio e final do século passado são equipamentos pesados, nos quais é difícil manter o alinhamento dos componentes óticos, motivo pelo qual não devem ser transportados para o local de análise. Usualmente a fonte de radiação é uma lâmpada de emissão contínua, que pode ser de xenônio ou mercúrio. O critério para a seleção de uma ou outra lâmpada depende da condição necessária para o procedimento analítico. Na hipótese de se precisar do maior número de comprimentos de onda possíveis para a excitação da amostra, opta-se pela lâmpada de xenônio, mas, no caso de a amostra apresentar fraca absorção, é mister uma maior intensidade nos comprimentos de onda emitidos, então a escolha deve ser pela lâmpada de mercúrio⁴⁷.

Nos espectrofluorímetros atuais, utilizam-se como fontes de radiação os LEDs, tornando os equipamentos mais versáteis, leves e passíveis de transporte para o local da análise. Neles deve-se escolher o LED com a emissão de interesse. É comum se fazerem arranjos de dois ou mais LEDs e se escolher o mais adequado à medida de interesse utilizando análise covariante de dados.

Os espectrofluorímetros que possuem fonte de emissão contínua fornecem dois tipos de espectros: espectros de fluorescência (emissão) e espectros de excitação.

Na obtenção do espectro de fluorescência ou de emissão a amostra deve ser irradiada com um comprimento de onda fixo, e a intensidade de luz reemitida é medida em uma faixa espectral definida. A escolha do comprimento de onda de excitação ideal para o registro do espectro de emissão é feita, em geral, com base no espectro de absorção. Na espectrofluorimetria tradicional se utilizava, comumente, o comprimento de onda de máxima absorção. Hoje em dia, busca-se não o máximo da emissão fluorescente, mas sim a faixa de comprimento de onda na qual a emissão fluorescente é mais sensível à propriedade ou substância que se quer medir.

Para o registro do espectro de emissão, após a definição do comprimento de onda de excitação, este deve permanecer fixo, e passa-se então a registrar as intensidades de emissão nos diversos comprimentos de onda da banda de emissão⁴⁷. Essa técnica é mais utilizada em medidas rotineiras ou em tempo real.

Para o registro do espectro de excitação, seleciona-se o comprimento de onda de emissão correspondente ao máximo da banda de absorção e faz-se variar os comprimentos de onda de excitação sobre toda a faixa do seu espectro de absorção⁴⁷. Essa técnica é mais utilizada em laboratórios para fins puramente científicos ou didáticos.

2.3.2 Espectroscopia no UV-Vis

A espectroscopia, de forma genérica, consiste no estudo da radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo. A espectroscopia no UV-Vis permite determinar a absorção da luz numa amostra no intervalo de comprimentos de onda compreendido entre 200 nm e 800 nm. A região ultravioleta no espectro é geralmente considerada na faixa de 200 nm e 400 nm, e a região do visível entre 400 nm e 800 nm. As energias correspondentes a essas regiões são ao redor de 150 K.cal.mol⁻¹ a 72 K.cal.mol⁻¹ na região ultravioleta, e 72 K.cal.mol⁻¹ a 36 K.cal.mol⁻¹ para a região visível⁴⁸. Energias dessa magnitude correspondem, muitas vezes, à diferença entre estados eletrônicos de muitas moléculas. A absorção da região visível e ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode

ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada⁴⁸⁻⁴⁹.

Para a determinação espectrofotométrica na região ultravioleta é necessário empregar células de quartzo que não absorvem nessa zona do espectro. É um método de análise baseado na propriedade de que espécies químicas iônicas ou moleculares absorvem radiações na região do ultravioleta e visível. As radiações nessas regiões envolvem fótons com energia suficiente para provocar transições de elétrons de valência, sendo um processo específico relacionado com a estrutura molecular da espécie absorvente. A quantidade dos fótons absorvidos será sempre proporcional ao número de centros absorventes que a radiação encontra ao longo do seu percurso através da solução⁴⁷.

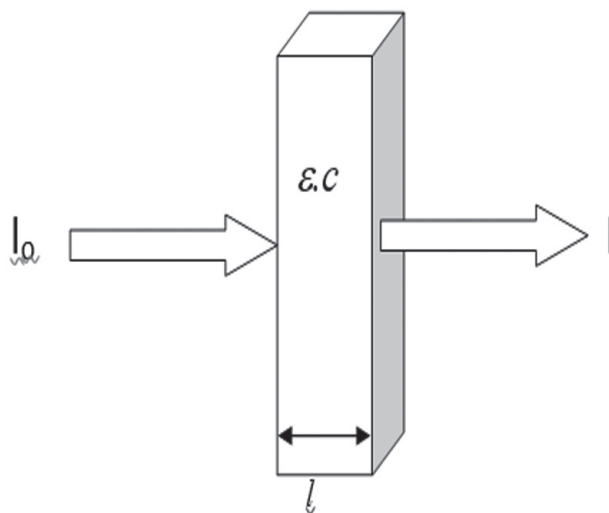


Figura 2.7 Ilustração da lei de Lambert-Beer: $\text{Log} (I_0/I) = A = \epsilon \cdot c \cdot l$.

O método está fundamentado nos princípios teóricos da lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação entre a absorbância de uma solução e a sua concentração. A absorbância é o logaritmo do quociente entre a intensidade da luz incidindo na solução (I_0) e a intensidade da luz saindo da solução (I):

$$\text{Log} (I_0/I) = A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Em que A = absorvância; ϵ = absortividade molecular ou coeficiente de extinção; c = concentração do material absorvedor; l = espessura da amostra através da qual a luz passa.

A absorção na região visível e ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada. Do ponto de vista prático, o aspecto mais importante do cálculo quântico é a determinação de quanta luz é absorvida pela amostra. Entre os compostos orgânicos, os que possuem dupla ligação absorvem fortemente no ultravioleta remoto. Os compostos que possuem ligações simples e duplas alternadamente, chamadas de ligações conjugadas, produzem absorção em comprimentos de ondas maiores. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, mais longos serão os comprimentos de onda absorvidos, podendo chegar à região do visível⁴⁹.

O processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético, ou seja, que mede a radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo, é designado espectrofotometria.

Denominam-se de espectrofotômetros os instrumentos capazes de registrar dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda. O espectro é o registro dos dados, sendo denominado espectro de absorção e espectro de transmissão, de acordo com o dado registrado, se absorvância ou transmitância, respectivamente. O espectro de absorção é característico de cada espécie química, sendo possível a identificação de uma espécie química por seu “espectro de absorção”.

Uma particularidade importante dos espectrofotômetros é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer. Quando a região espectral usada é a UV/Vis,

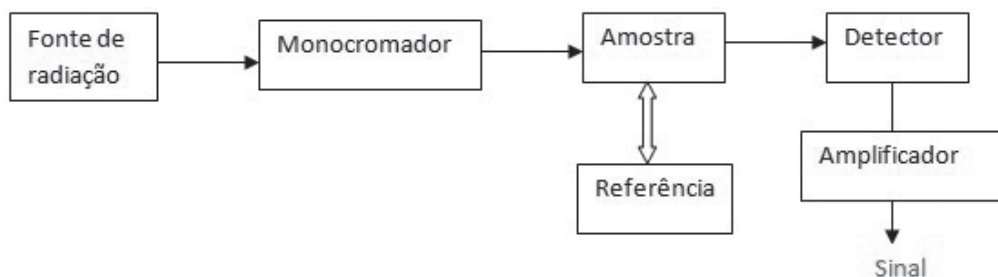


Figura 2.8 Esquema de um espectrofotômetro. Fonte própria.

são necessários componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis, capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Os espectrofotômetros, em geral, contêm cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal (Figura 2.8)⁵⁰.

2.4 QUIMIOMETRIA

A introdução da instrumentação analítica fornecendo respostas multivariadas para cada amostra analisada associada à disponibilidade de computadores, bem como de programas estatísticos sofisticados, fez surgir a quimiometria⁵¹, que é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada, podendo ser definida como uma área da química que visa planejar ou otimizar a seleção de procedimentos experimentais, empregando métodos matemáticos e estatísticos na análise dos dados resultantes que terminam por fornecer o máximo de informação química relevante, além de conhecimentos sobre sistemas químicos⁵²⁻⁵⁴.

A análise multivariada consiste na verificação da relação entre grupos de variáveis dependentes coletadas sobre a mesma amostra e corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos⁵⁵⁻⁵⁷.

Com o crescimento da aplicação da quimiometria foram desenvolvidas novas ferramentas, não só para o planejamento de experimentos^{54,58} como para o tratamento de dados, encontrando aplicações distintas conforme o objetivo do estudo, por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados e as determinações qualitativas e quantitativas. Podem ser citadas como exemplos as técnicas de: análise por componentes principais (PCA), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), regressão por componentes principais (PCR), análise paralela de fatores (PARAFAC) e Tucker. Da mesma forma, podem ser citadas técnicas fundamentadas em distâncias, como: análise hierárquica de agrupamentos (HCA), técnicas baseadas em inteligência artificial como redes neurais e algoritmo genético, técnicas de lógica como lógica *f*, entre outros métodos, que têm sido utilizadas por décadas para tratamento de dados complexos^{2,5,6,59,60}.

2.4.1 Análise de componentes principais (PCA)

Uma das ferramentas mais utilizadas da quimiometria nas mais diversas áreas de pesquisa tem sido a análise de componentes principais (PCA), que visa, principalmente, reduzir o número de variáveis, eliminar dados redundantes e facilitar a interpretação dos dados, sendo considerado um método descritivo e exploratório.

Os componentes principais resultam da transformação de um conjunto de variáveis aleatórias correlacionadas em um conjunto de variáveis não correlacionadas e ortogonais entre si. Essas variáveis são combinações lineares das variáveis originais, sendo que a primeira variável ou primeira componente principal obtida com essa transformação é responsável pela maior variância do conjunto original de dados, em sequência a segunda componente ou segunda variável é responsável pela maior variância restante, não havendo correlação com a primeira. Nessa mesma linha, a terceira componente é responsável pela maior variância restante e não é correlacionada com a primeira e com a segunda componentes, e assim por diante. Dessa forma, a importância relativa das componentes principais decresce da primeira para a última⁶¹.

No entanto, as componentes principais de interesse em cada caso devem ser escolhidas de modo que expliquem a análise da propriedade ou de substâncias de interesse em cada caso. Pode acontecer, por exemplo, de as componentes principais com maior variância explicarem a propriedade de interesse⁶² ou aspectos básicos, como variações de temperatura de tubos de aço expostos ao sol, e não a propriedade de interesse, no caso, a microdegradação estrutural desses mesmos tubos de aço⁶³.

Além de ser capaz de separar informações importantes das incertas, desnecessárias e repetidas, a PCA auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, sendo, por conseguinte, um método exploratório⁶⁴. Neste tipo de análise, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados, mediante a geração de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (CP), nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das componentes principais, relativamente às amostras. Os *loadings*, por sua vez, fornecem a composição das componentes principais em relação às variáveis. Tendo em vista que as componentes principais são ortogonais, ou seja, estão todas a 90° uma em relação à outra, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e dos *loadings*. O estudo do conjunto de *scores* e *loadings* permite, ainda, estimar a influência de cada variável em cada amostra^{53,65-66}.

2.4.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

O processo que possibilita relacionar um sinal analítico ou resposta instrumental com uma determinada propriedade da amostra é denominado de calibração. O modelo ou método de calibração é a equação matemática que irá descrever a relação sinal *versus* propriedade, podendo ser definido ainda como o processo matemático ou estatístico de extração de informação a partir do sinal instrumental. A representação gráfica da relação sinal *versus* propriedade é feita mediante construção da curva analítica ou de calibração^{57,67}. O método de calibração pode ser classificado em univariado e multivariado, linear e não linear, direto ou indireto, clássico e inverso, respectivamente, de acordo com critérios relativos ao número de variáveis, tipo de função matemática, obtenção dos parâmetros de calibração e a variável independente⁶⁸.

Denomina-se calibração univariada quando a relação matemática estabelecida ocorre entre uma única variável dependente e uma única variável independente. Na calibração multivariada a relação envolve mais de uma variável.

A calibração multivariada tem sido aplicada em estudos relacionados com os alimentos, agricultura, indústria e meio ambiente⁵⁶⁻⁵⁷. Dentre os métodos de calibração multivariada empregados com maior frequência, a regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês, *partial least square* – PLS) é um dos métodos principais⁵⁷.

Para um modelo de calibração ser dito linear, as variáveis dependentes estão relacionadas com funções lineares das variáveis independentes; não se observando essa relação, o modelo é não linear. A calibração é direta quando os parâmetros são conhecidos diretamente a partir do sinal analítico de cada um dos analitos de forma individual, e indireta quando os parâmetros são determinados a partir dos sinais analíticos de misturas de componentes. Quando a concentração é a variável independente e o sinal analítico a variável dependente, caracteriza-se a calibração clássica; em caso reverso, a calibração é inversa^{59,68}.

O princípio básico da calibração multivariada é a quantificação de uma variável dependente, mediante a utilização concomitante de muitas variáveis independentes para quantificar. No campo das análises químicas, com o avanço da instrumentação e automação dos laboratórios gerando uma enorme quantidade de dados, tabelas e gráficos para serem identificados, classificados e interpretados de forma eficiente, a calibração multivariada passou a ser largamente empregada, principalmente nos casos em que os resultados da análise gerados pelo equipamento apresentam superposição

de sinais ou quando se deseja fazer determinações simultâneas de analitos. A calibração multivariada é uma técnica aplicada a matrizes reais complexas, em que os procedimentos de separação e tratamentos químicos necessários para aplicar a calibração usual simples são caros e demorados. Dentre os métodos de calibração multivariada, como previamente dito, destaca-se o método de regressão por mínimos quadrados parciais, por ser um dos empregados com maior frequência⁶⁹.

O método de regressão por mínimos quadrados parciais é um modelo baseado em variáveis latentes (fatores), em que cada fator é definido como uma combinação linear das variáveis originais das matrizes X (variáveis independentes) ou Y (variáveis dependentes). Assim sendo, é um método linear de calibração multivariada, pois os dados das variáveis independentes X e dependentes Y são utilizados para estabelecer um modelo de regressão linear. Esse método consiste em decompor ou modelar as matrizes originais, tanto a matriz X como a matriz Y, formando dois conjuntos de fatores lineares ou grupos de matrizes denominados de escores (*scores*) e pesos (*loadings*), sendo, por conseguinte, um método bilinear^{69,70}.

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) consiste em encontrar um conjunto de componentes principais (vetores base) para os dados espectrais e um conjunto separado de componentes principais para os dados da propriedade pesquisada, relacionando, em seguida, um conjunto com o outro, buscando encontrar uma perfeita linearidade entre os escores, ou seja, entre as projeções dos dados espectrais e dos dados da propriedade sobre seus respectivos fatores. Por exemplo, através do PLS é possível correlacionar dados espectrais de amostras com suas respectivas concentrações.

2.5 DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Recentemente, diversos artigos e patentes foram publicados associando a espectrofluorimetria a LED com a quimiometria. Alguns exemplos são listados a seguir:

- 1) Descrevem novos equipamentos^{28,46}.
- 2) Identificam substâncias puras ou em formulações^{2,4,71}.
- 3) Predizem o conteúdo de gordura animal em misturas com óleo vegetal⁶⁰.
- 4) Permitem determinar o teor de acetileno e gases combustíveis em óleos de transformadores^{62,72-73}.

- 5) Avaliam a degradação do papel isolante em transformadores de alta potência⁷⁴.
- 6) Permitem a predição das propriedades de blendas de biodiesel em diesel inclusive de massa específica e viscosidade por métodos óticos^{6,29,75}.
- 7) Fazem a identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3D e análise das componentes principais³.
- 8) Determinam a adulteração de óleo vegetal por monitoramento da presença da clorofila^{76,77}.
- 9) Determinam a estabilidade oxidativa de óleos e de biodiesel por espectrofluorimetria associada a quimiometria⁵.

2.5.1 Protocolo

O protocolo do método consiste nas etapas descritas a seguir.

- 1) Definição da técnica espectroscópica. As técnicas já testadas foram espectrofluorimetria e espectrofotometria no UV-Vis.
- 2) Preparação dos padrões.
- 3) Realização da análise espectroscópica. Um exemplo é a obtenção dos mapas espectrofluorimétricos onde as substâncias padrões são colocadas em cubetas de quartzo de 1 cm de percurso ótico e analisadas em espectrofluorímetro. As soluções das substâncias padrões são submetidas à radiação de fonte com amplo espectro e realizam-se as medidas. A faixa de excitação varia entre 200 nm e 900 nm, sendo preferida a faixa entre 400 nm e 600 nm. A faixa de comprimento de onda de emissão varia entre 230 nm e 950 nm, preferivelmente entre 430 nm e 650 nm. As medidas são feitas fixando o comprimento de onda de excitação no seu valor inicial e variando o comprimento de onda de emissão desde o valor inicial até ao valor final, com um passo que pode ser entre 0,01 nm e 50 nm, sendo preferido aquele entre 0,1 nm e 10 nm, e preferido ainda aquele entre 0,5 nm e 1 nm. As fendas de emissão e excitação variam entre 2,5 nm e 10 nm, preferivelmente 2,5 nm com velocidade de varredura de 1.200 nm/min. As medidas são feitas fixando o comprimento de onda de excitação inicialmente em 400 nm, com incremento de 25 nm a cada aquisição e variando os comprimentos de onda de emissão de 430 nm a 650 nm com incremento de 0,5 nm. São elaborados a seguir os mapas

de curvas de nível de fluorescência para cada amostra com o auxílio de *software* adequado, por exemplo, o Origin 8® (Figura 2.9).

- 4) Aplica-se o tratamento matemático aos dados coletados, com base em metodologias covariantes. As matrizes dos mapas espectrofluorimétricos são superpostas e organizadas sob a forma de uma matriz tridimensional em que a terceira dimensão é cada substância. Podem-se utilizar todos os dados obtidos ou apenas parte destes para se proceder à análise covariante. Os dados são processados por uma ou mais metodologia covariante. PCA e HCA podem ser utilizados para análise qualitativa como exemplos demonstrativos não restritivos. Já para a análise quantitativa empregam-se PLS e PCR.
- 5) Identificação da amostra desconhecida através da comparação com os padrões por aplicação da análise covariante de dados.

2.6 EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DO MÉTODO

2.6.1 Análise de substâncias fenólicas por espectrofluorimetria e quimiometria

Os padrões de ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina adquiridos de laboratório com certificação são utilizados para preparar soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol. Cada uma dessas soluções foi analisada em seis replicatas por espectrofluorimetria e os espectros submetidos a análise covariante (PCA). Foram selecionados ácido cafeico, ácido ferúlico, vanilina, quercetina e ácido salicílico para a construção de modelos de calibração multivariada por PLS.

Os espectros de fluorescência dessas soluções são adquiridos em espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS55 equipado com lâmpada de Xenônio de 150 W e cubetas de quartzo com 1 cm de percurso ótico e operando com o *software* PerkinElmer FL Winlab (versão 4.0). A excitação é iniciada em 400 nm com incremento de 25 nm, e a emissão é obtida na faixa de 430 nm a 650 nm com incremento de 0,5 nm, sendo obtidos nove espectros de emissão para cada leitura. As fendas de emissão e de excitação são de 2,5 nm e a velocidade de *scan* ou varredura é de, aproximadamente 1.200 nm.min⁻¹.

As matrizes e mapas são geradas com auxílio do *software* Origin 8.0®. No Matlab 6.1® é construída uma matriz 3D com dimensões equivalentes a 36 (número de amostras) × 442 (comprimentos de onda de emissão) × 9

(comprimentos de onda de excitação). Na sequência, a matriz 3D é transformada em uma matriz 2D com dimensões 36 (número de amostras) \times 3.978 pelo comando *unfoldm* do Matlab® 6.1, centrada na média e submetida à análise covariante.

Após a retirada das leituras anômalas restaram 32 amostras para a PCA, sendo seis de ácido cafeico, seis de ácido *p*-cumárico, seis de ácido ferúlico, seis de ácido gálico, três de vanilina e cinco de quercetina. A Figura 2.9 mostra os mapas de contorno de espectrofluorimetria dos compostos fenólicos comerciais analisados: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina. A substância menos fluorescente é a vanilina, e sua banda de fluorescência está centrada em 400 nm de excitação e 450 nm de emissão. Provavelmente, essa substância fluoresce quando excitada em comprimentos inferiores a 400 nm.

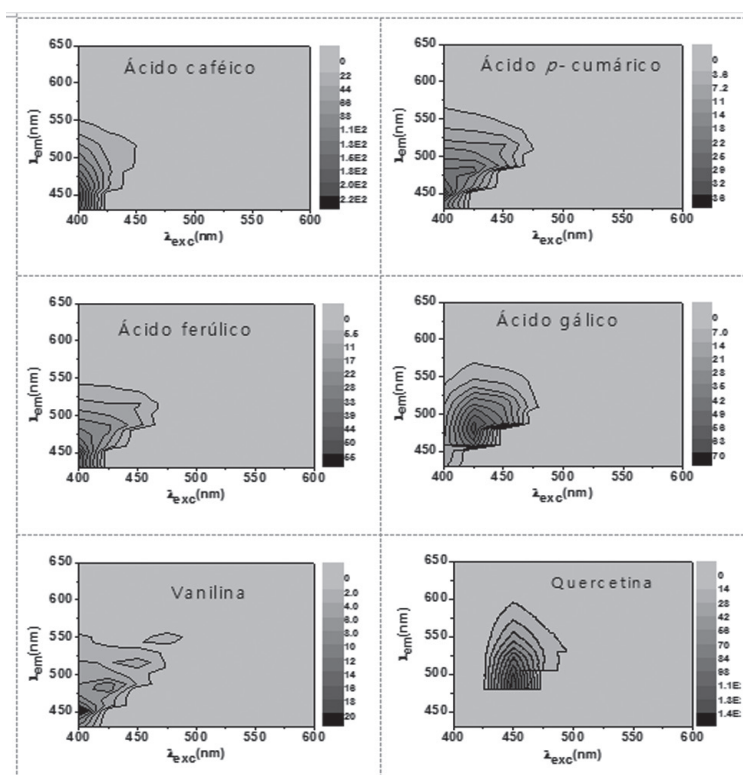


Figura 2.9 Mapas de fluorescência dos compostos fenólicos analisados.

Os ácidos cafeico, ferúlico e cumárico possuem mapas de contornos na mesma região do espectro. O pico máximo de fluorescência provavelmente está situado abaixo de 400 nm de excitação e não foi detectado na análise. O ácido gálico fluoresce quase que completamente na faixa do visível do espectro, com pico máximo de fluorescência em 425 nm de excitação e em 450 nm a 500 nm de emissão. Como esperado, em virtude de possuir cinco anéis aromáticos, a quercetina é a substância mais fluorescente, e sua banda de fluorescência se situa totalmente na região visível do espectro. Seu pico de fluorescência se situa em 450 nm de excitação e em 475 nm a 500 nm de emissão.

2.6.1.1 Análise de componentes principais (PCA)

Na PCA obtida com os espectros de fluorescência do ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina verifica-se que, com apenas três componentes principais é possível explicar 99,87% da variância dos dados, sendo 74,42% para PC1, 20,48% para PC2 e 4,98% para PC3 (Tabela 2.5). A Figura 2.10 mostra o correspondente gráfico de

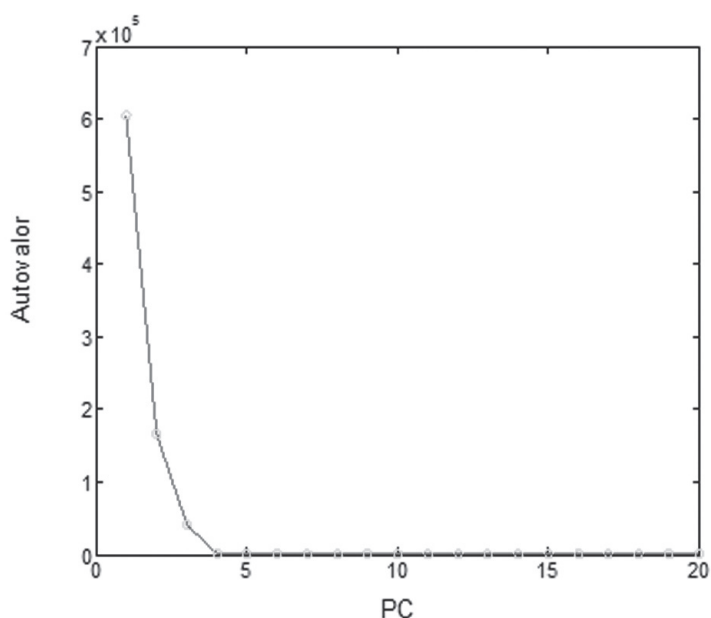


Figura 2.10 Gráfico de cotovelo (autovvalor x PC).

cotovelo (*screen plot*), que é um gráfico dos autovalores em função da ordem das componentes principais, em que se pode verificar que é possível selecionar apenas os três primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto se encontram apenas os resíduos, ou seja, componentes principais com menores porcentagens de variância.

A Figura 2.11 mostra o gráfico dos escores de PC1 \times PC2 \times PC3 para as matrizes dos espectros de fluorescência centradas na média. Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1 \times PC2 (Figura 2.12), pode-se observar que na segunda componente principal as amostras de quercetina apresentam os valores mais negativos, separando-se das demais. Já as amostras de ácido cafeico apresentam os valores mais negativos na primeira componente principal, afastando-se também das demais. Contudo, em PC1 \times PC3 (Figura 2.13) verifica-se que as amostras de ácido gálico apresentam os escores mais negativos em PC3 e se separam das demais. As amostras de ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e vanilina apresentaram-se bastante próximas.

Nos gráficos de *loadings* (pesos) os comprimentos de onda que mais influenciam são 400 nm de excitação e 448 nm de emissão para PC1 (Figura 2.14), 450 nm de excitação e 487,5 nm de emissão para PC2 (Figura 2.15) e 425 nm de excitação e 476 nm de emissão para PC3 (Figura 2.16). Com base nesses dados, para separar o ácido cafeico das demais substâncias o melhor comprimento de onda de excitação é 400 nm de excitação e 448 nm o melhor comprimento de onda de emissão, pois estes são os comprimentos de onda que mais influenciam no gráfico de *loading* para PC1 (Figura 2.14).

Do mesmo modo, para separar quercetina das demais substâncias o melhor comprimento de onda de excitação é 450 nm e o melhor comprimento de onda de emissão é 487,5 nm, pois estes são os comprimentos de onda que mais influenciam no gráfico de *loading* para PC2 (Figura 2.15).

Tabela 2.5 Porcentagem de variância capturada pelo modelo PCA

| PC | AUTOVALOR | % DE VARIÂNCIA CAPTURADA COM ESTE PC | % TOTAL DE VARIÂNCIA CAPTURADA |
|----|-----------|---|-----------------------------------|
| 1 | 6,05e+005 | 74,42 | 74,42 |
| 2 | 1,66e+005 | 20,48 | 94,89 |
| 3 | 4,04e+004 | 4,98 | 99,87 |
| 4 | 6,90e+002 | 0,08 | 99,96 |

| PC | AUTOVALOR | % DE VARIÂNCIA CAPTURADA COM ESTE PC | % TOTAL DE VARIÂNCIA CAPTURADA |
|----|-----------|---|-----------------------------------|
| 5 | 1,07e+002 | 0,01 | 99,97 |
| 6 | 3,36e+001 | 0,00 | 99,97 |
| 7 | 2,62e+001 | 0,00 | 99,98 |
| 8 | 2,57e+001 | 0,00 | 99,98 |
| 9 | 1,66e+001 | 0,00 | 99,98 |
| 10 | 1,54e+001 | 0,00 | 99,98 |

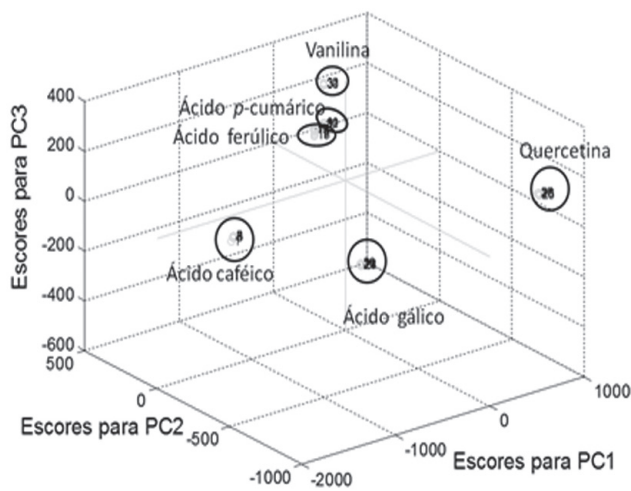


Figura 2.11 PC1 × PC2 × PC3 de espectros de fluorescência de alguns compostos fenólicos.

2.6.1.2 Calibração Multivariada por PLS

Ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico, substâncias selecionadas para a construção dos modelos PLS são analisadas em solução metanólica.

As soluções estoques de ácido cafeico e ácido ferúlico são preparadas pesando-se 100 mg de cada substância separadamente e dissolvendo-se cada uma em 20 mL de metanol. Dessa forma, são obtidas soluções individuais na concentração de 5 mg/mL, respectivamente de ácido cafeico e ácido ferúlico. A seguir, de cada solução estoque são preparadas as soluções:

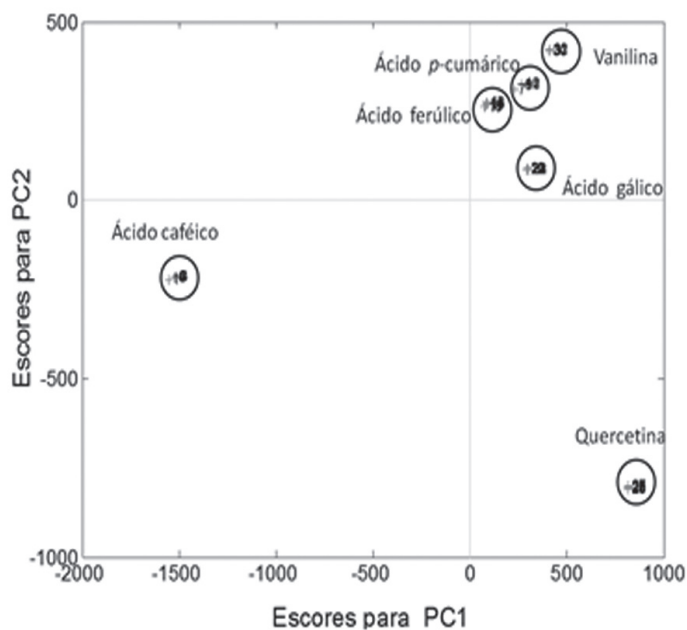


Figura 2.12 PC1 \times PC2 de espectros de fluorescência de alguns compostos fenólicos.

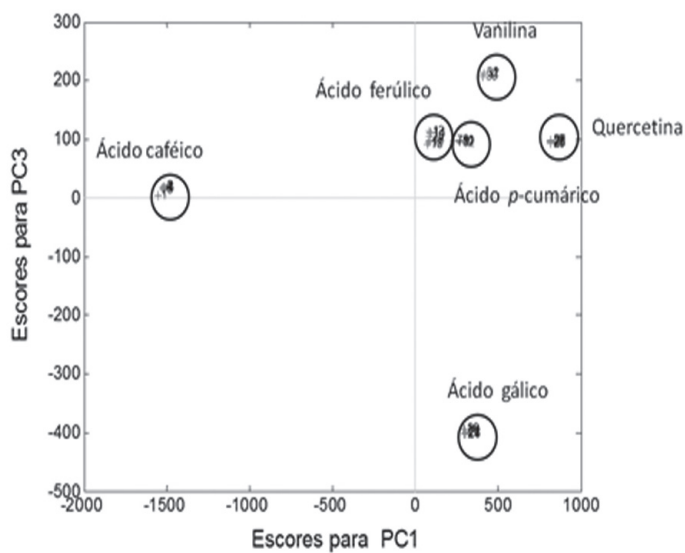


Figura 2.13 PC1 \times PC3 de espectros de fluorescência de alguns compostos fenólicos.

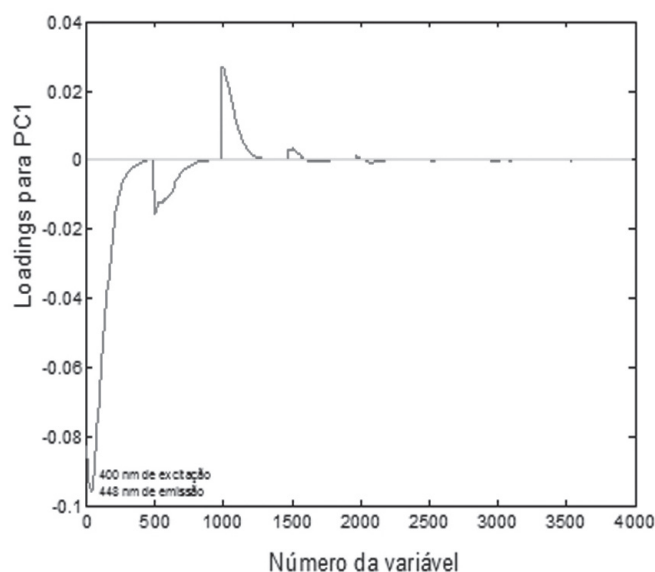


Figura 2.14 Loading para PC1.

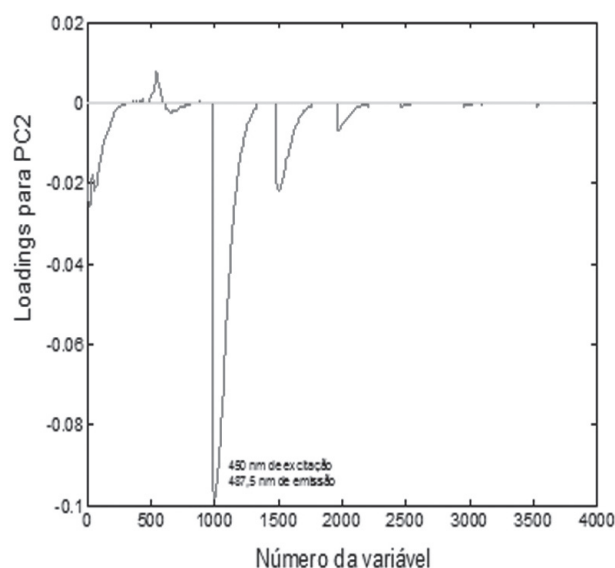


Figura 2.15 Loading para PC2.

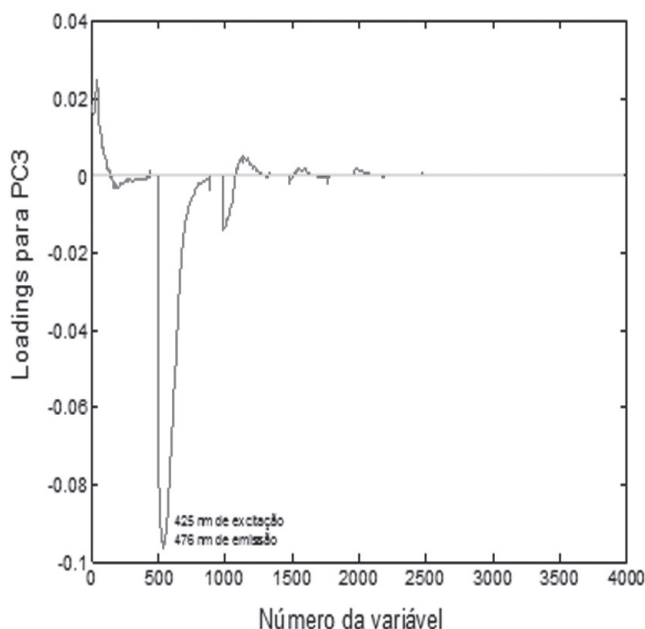


Figura 2.16 Loading para PC3.

- Solução A: pipetar 1 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução A = 1 mg/mL
- Solução A1: pipetar 2 mL da solução A e completar 4 mL com metanol. Concentração da solução A1 = 0,5 mg/mL
- Solução B: Pipetar 2 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução B = 2 mg/mL
- Solução C: Pipetar 2,5 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução C = 2,5 mg/mL
- Solução D: Pipetar 3 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução D = 3 mg/mL
- Solução D1: Pipetar 2 mL da solução D e completar 4 mL com metanol. Concentração da solução D1 = 1,5 mg/mL
- Solução E: Pipetar 3,5 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução E = 3,5 mg/mL
- Solução F: Pipetar 4 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução F = 4 mg/mL

São desenvolvidos modelos de regressão para ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico. Cada modelo PLS é desenvolvido usando-se regressão por PLS através do *software* Unscrambler® 10.1. As matrizes espectrais de cada substância são organizadas em uma matriz geral centrada na média em que as amostras estão nas linhas. Na sequência por inserção de uma nova coluna para essa matriz geral são adicionados os valores de concentração da substância. Através do *software* define-se a coluna das concentrações como a variável dependente e os espectros de fluorescência como as variáveis independentes.

Através do *software* Unscrambler® 10.1 são construídos os modelos PLS relacionando os espectros de fluorescência com os valores de concentração. O PLS consiste de dois passos, denominados de calibração e validação. No passo de calibração, o *software* estima a relação entre os espectros e as concentrações do conjunto de amostras padrões. No passo de validação, o *software* avalia a capacidade do modelo de realizar determinações, isto é, a sua capacidade preditiva.

A Tabela 2.6 apresenta as concentrações usadas de ácido cafeico e de ácido ferúlico na construção dos respectivos modelos PLS, e a Tabela 2.7 apresenta as concentrações usadas de ácido gálico no seu modelo PLS. As figuras 2.17 a 2.19 apresentam as curvas dos modelos PLS para as substâncias ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico.

Tabela 2.6 Concentrações usadas de ácido cafeico e de ácido ferúlico para construção dos modelos PLS

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO (MG/ML) |
|---------|----------------------|
| 1 | 0,5 |
| 2 | 1 |
| 3 | 1,5 |
| 4 | 2 |
| 5 | 2,5 |
| 6 | 3 |
| 7 | 3,5 |
| 8 | 4 |
| 9 | 5 |

Tabela 2.7 Concentrações usadas de ácido gálico para construção do PLS

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO (MG/ML) |
|---------|----------------------|
| 1 | 2 |
| 2 | 2,5 |
| 3 | 3 |
| 4 | 3,5 |
| 5 | 5 |

Cada gráfico mostra para cada substância os valores preditos *versus* os valores de referência das concentrações.

Existem várias medidas estatísticas que fornecem informações sobre o modelo PLS. As mais usadas são o coeficiente de correlação (R), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente angular e coeficiente linear.

O coeficiente de correlação linear (R) mede a grandeza da correlação linear entre variáveis intituladas. O valor da correlação varia entre $+1$ e -1 . Uma correlação próxima a zero indica que não há correlação entre as duas variáveis. Uma correlação positiva indica que as duas variáveis movem juntas, ou seja, quando uma cresce a outra também cresce, e a relação é forte quanto mais o valor do coeficiente de correlação se aproxima de $+1$. Uma correlação negativa indica que as duas variáveis movem-se em direções opostas, ou seja, quando uma variável aumenta, a outra diminui e que a relação também fica mais forte quanto mais próxima de -1 . Os coeficientes de correlação próximos a 1, nos modelos das figuras 2.17 a 2.19, respectivamente de 0,992507, 0,9940584, 0,9911911, mostram a forte correlação entre os dados da análise espectrofluorimétrica e os dados das concentrações, e indica que as variáveis dependentes e independentes estão perfeitamente correlacionadas positivamente, movendo-se essencialmente em perfeita proporção na mesma direção.

O coeficiente de determinação (R^2) indica o grau de ajuste da reta aos dados. Utiliza-se o símbolo R^2 porque é o quadrado do coeficiente de correlação amostral entre as duas variáveis. Os parâmetros da regressão são sempre estimados com algum ruído, em função do fato de que todo dado é medido com erro. R^2 mede a proporção da variabilidade em Y que é explicada por X . É uma função direta da correlação entre as variáveis. O R -quadrado indica a precisão da reta de regressão, isto é, o grau de ajuste da reta aos dados. Quanto mais próximo de $+1$ ou de -1 o valor do R -quadrado,

maior a eficiência do modelo para realizar as predições. Nos modelos das figuras 2.17 a 2.19, os valores de R-quadrado são respectivamente de 0,98507, 0,98815, 0,98246, indicando a eficiência dos modelos para realizar as predições das concentrações a partir dos espectros de fluorescência.

O coeficiente angular (*slope*) da reta do modelo PLS indica o grau de eficiência do modelo nas predições das propriedades consideradas. Quanto mais próximo de 1, maior a eficiência do modelo, pois o coeficiente angular indica a tangente do ângulo entre a reta e a abscissa. Um coeficiente angular de 1 indica que o ângulo entre a reta e a abscissa é de 45°, ou seja que os valores preditos pelo modelo são iguais aos valores de referência. Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente angular, maior a eficiência do modelo nas predições das concentrações. Os coeficientes angulares dos modelos das figuras 2.17 a 2.19, respectivamente de 0,9850701, 0,9881522 e 0,9824599, estão próximos de 1, indicando modelos eficientes.

O coeficiente linear (*offset*) é a intercepção da reta no eixo das ordenadas, ou seja, o valor que Y (predito) terá quando Y (referência) é zero. Os valores dos coeficientes lineares indicam a ocorrência de erros determinados nas predições realizadas pelos modelos. Quanto mais próximo de zero os valores dos coeficientes lineares, menores são os erros determinados. Nos modelos das figuras 2.17 a 2.19, os valores dos coeficientes lineares de 0,038, 0,030 e 0,056 estão próximos de zero, demonstrando que há pouca ocorrência de erros determinados na predição dos modelos.

A linha vermelha mostra a validação do modelo através da validação cruzada feita pelo *software* Unscrambler®. A validação consiste em testar o modelo prevendo concentrações de amostras. O *software* realiza a validação cruzada, isto é, seleciona subconjuntos do conjunto de calibração que são utilizados no cálculo do modelo. Quanto mais coincidentes as retas de

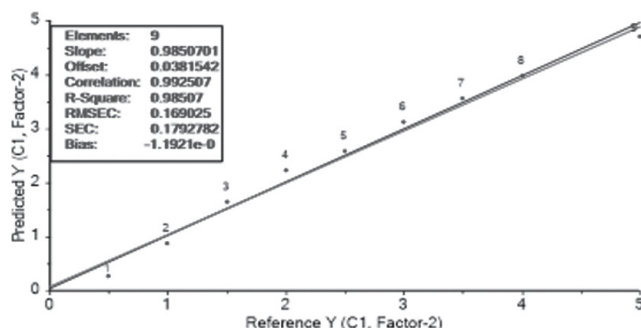


Figura 2.17 Modelo PLS para o ácido cafeico na faixa de 0,5 mg/mL a 5 mg/mL.

calibração e validação, mais eficiente o modelo PLS. Com relação ao processo de validação, a linha de validação para o modelo PLS do ácido ferúlico é pouco coincidente com a linha de calibração.

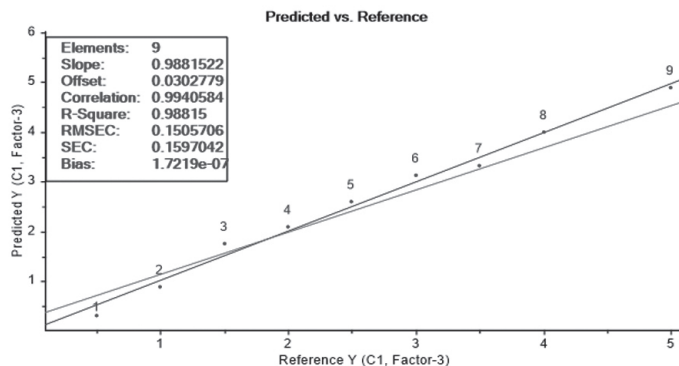


Figura 2.18 Modelo PLS para o ácido ferúlico na faixa de 0,5 mg/mL a 5 mg/mL.

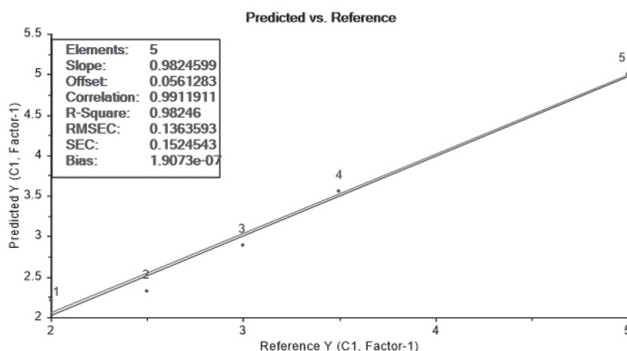


Figura 2.19 Modelo PLS para o ácido gálico na faixa de 2 mg/mL a 5 mg/mL.

2.6.2 Análise de combustíveis e suas formulações

O método foi usado para determinar simultaneamente a concentração, a viscosidade e a massa específica de misturas de biodiesel em diesel.

2.6.2.1 Amostras

O conjunto de dados foi constituído de misturas preparadas usando amostras de biodiesel e diesel fornecidas pela Petrobras. Foram utilizados dois tipos de biodiesel: o biodiesel de soja e o biodiesel de algodão. Misturas de biodiesel em diesel foram feitos nas concentrações de 0 a 100% como mostrado na Tabela 2.8.

2.6.2.2 Método de referência para medições de viscosidade

As medidas de viscosidade de misturas de biodiesel de soja em diesel e biodiesel de algodão em diesel (Tabela 2.8) foram feitas usando o MCR 501 reômetro Anton Paar a 25 °C, com taxa de cisalhamento na faixa de 10 s⁻¹ a 100 s⁻¹.

2.6.2.3 Método de referência para medições de massa específica

As densidades específicas foram determinadas por cálculo, dividindo a massa de cada amostra de um volume fixo (5 mL), medido na micropipeta pela massa do mesmo volume de água destilada à temperatura ambiente (25 °C). A medida foi realizada três vezes para cada amostra.

Tabela 2.8 Concentração, viscosidade e massa específica a 25 °C

| AMOSTRA | % DE BIODIESEL EM DIESEL | VISCOSIDADE (CP) DE MISTURA DE BIODIESEL DE SOJA EM DIESEL | VISCOSIDADE (CP) DE MISTURA DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM DIESEL | MASSA ESPECÍFICA DE MISTURAS DE BIODIESEL DE SOJA EM DIESEL | MASSA ESPECÍFICA DE MISTURAS DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM DIESEL |
|---------|--------------------------|--|---|---|--|
| 1 | 0 | 3,6015 | 3,5915 | 0,821 | 0,823 |
| 2 | 5 | 3,6635 | 3,6835 | 0,824 | 0,828 |
| 3 | 10 | 3,665 | 3,687 | 0,832 | 0,830 |
| 4 | 15 | 3,73 | 3,712 | 0,834 | 0,832 |
| 5 | 20 | 3,7545 | 3,7785 | 0,836 | 0,834 |
| 6 | 25 | 3,7995 | 3,8435 | 0,838 | 0,841 |

| AMOSTRA | % DE BIODIESEL EM DIESEL | VISCOSIDADE (CP) DE MISTURA DE BIODIESEL DE SOJA EM DIESEL | VISCOSIDADE (CP) DE MISTURA DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM DIESEL | MASSA ESPECÍFICA DE MISTURAS DE BIODIESEL DE SOJA EM DIESEL | MASSA ESPECÍFICA DE MISTURAS DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM DIESEL |
|---------|--------------------------|--|---|---|--|
| 7 | 30 | 3,858 | 3,8875 | 0,851 | 0,842 |
| 8 | 35 | 3,9375 | 3,974 | 0,844 | 0,846 |
| 9 | 40 | 3,998 | 4,017 | 0,851 | 0,852 |
| 10 | 50 | 4,255 | 4,128 | 0,852 | 0,858 |
| 11 | 60 | 4,2555 | 4,308 | 0,865 | 0,863 |
| 12 | 70 | 4,391 | 4,463 | 0,867 | 0,867 |
| 13 | 80 | 4,533 | 4,6655 | 0,876 | 0,875 |
| 14 | 90 | 4,6865 | 4,8505 | 0,887 | 0,883 |
| 15 | 100 | 4,8655 | 5,046 | 0,898 | 0,885 |

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro UV-Vis – Quimis modelo Q798FIL com LED (*light emitting diode*) com cubetas de quartzo e caminho ótico de 1 cm. Os espectros de fluorescência das amostras foram obtidas excitando as amostras com LED centrado em 400 nm, e a emissão captada no intervalo de 350 nm a 1.000 nm com um incremento de 1 nm (651 comprimentos de onda de emissão). Os espectros foram organizados em uma matriz geral de 15 × 651 (amostras contra comprimentos de onda de emissão), centrados na média e depois analisados por PLS.

2.6.2.4 Calibrações multivariadas

Neste estudo foram desenvolvidos três modelos de regressão: um para determinar a concentração de biodiesel em misturas com diesel, outro para determinar a massa específica e outro para estimar a viscosidade de misturas de biodiesel em diesel. Cada modelo de calibração multivariada foi desenvolvido por regressão PLS utilizando a região previamente estabelecida por PCA. Os modelos de calibração foram construídos usando o *software* Unscrambler® 10.0.1. As matrizes gerais (15 × 651) foram utilizadas para construir os modelos matemáticos por PLS pela adição de uma coluna correspondente a cada propriedade de interesse (concentração, massa específica ou viscosidade). Cada modelo PLS foi construído e calibrado utilizando os dados dos espectros de fluorescência centrados na média como variáveis

independentes e a medida dos valores da propriedade de interesse (concentração, massa específica ou viscosidade) como variáveis dependentes. Na validação do modelo os dados espectrais foram utilizados para prever os valores da concentração, viscosidade e massa específica das correspondentes misturas de biodiesel de soja em diesel ou de biodiesel de algodão em diesel (Tabela 2.8).

2.6.2.5 Resultados e discussão

O PCA construído usando como variáveis todo o espectro de fluorescência das misturas de biodiesel de soja em diesel mostrou que dois componentes principais (PC1 e PC2) foram responsáveis por capturar 99,8% da variância (Figura 2.20). Para as misturas de biodiesel de algodão em diesel, também construído com todo o espectro de fluorescência, mostraram que PC1 e PC2 foram responsáveis pela captura de 99,9% da variância (Figura 2.21).

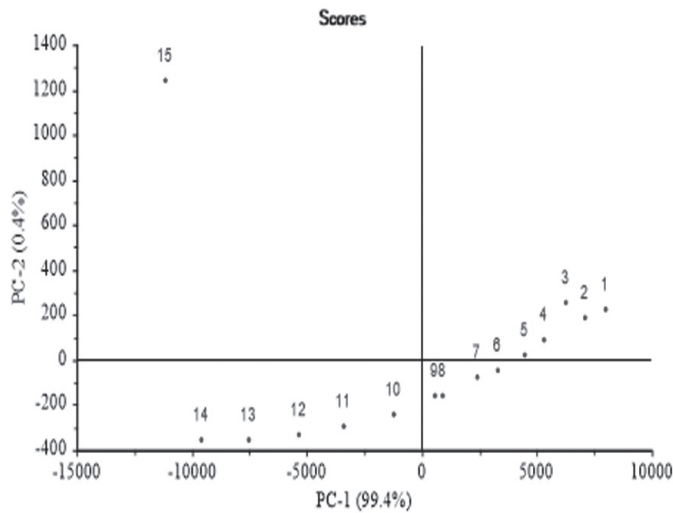


Figura 2.20 Escores PC1 × PC2 de misturas de biodiesel de soja em diesel.

Inicialmente, cada modelo PLS foi construído com todos os dados e foram avaliadas a seguir, a fim de detectar amostras anômalas. Em seguida,

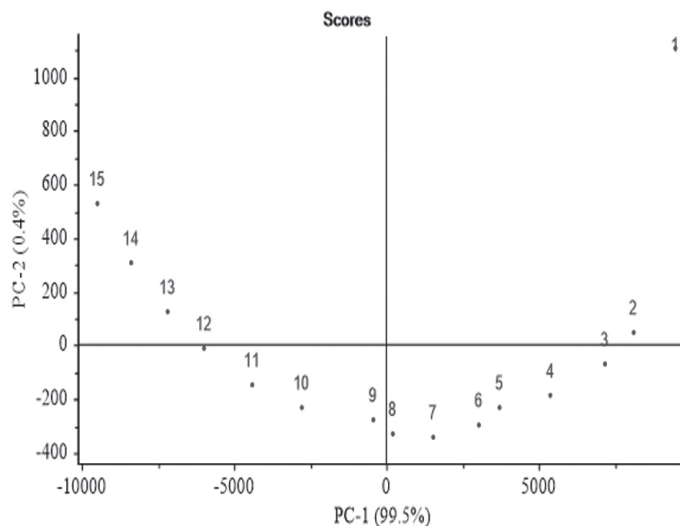


Figura 2.21 Escores PC1 \times PC2 de misturas de biodiesel de algodão em diesel.

os modelos foram reconstruídos com o conjunto restante das amostras. A amostra 7, com 30% de biodiesel de soja em diesel, foi detectada como anômala e removida do conjunto de dados no desenvolvimento dos modelos PLS para a determinação da concentração, massa específica, viscosidade de misturas de biodiesel de soja em diesel (figuras 22 a 24). Do mesmo modo, a amostra 15, com 100% de biodiesel de algodão em diesel, foi detectada como anômala e removida do conjunto de dados no desenvolvimento do modelo PLS para determinar a concentração, massa específica e viscosidade de misturas de algodão de biodiesel a diesel (figuras 25 a 27).

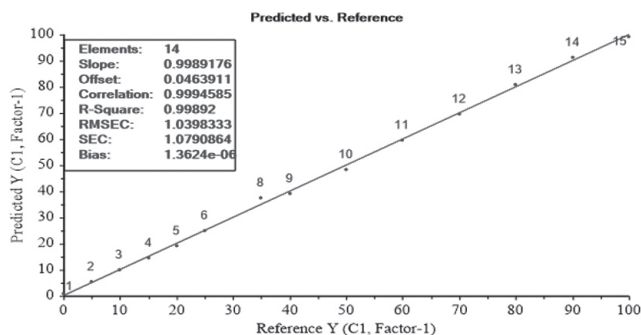


Figura 2.22 Modelo PLS para determinação da concentração de misturas de biodiesel de soja em diesel.

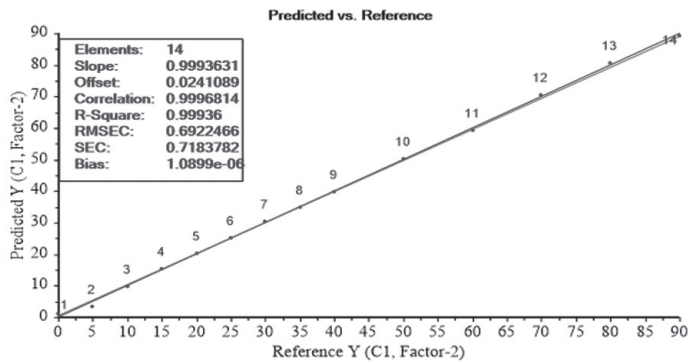


Figura 2.23 Modelo PLS para determinação da concentração de misturas de biodiesel de algodão em diesel.

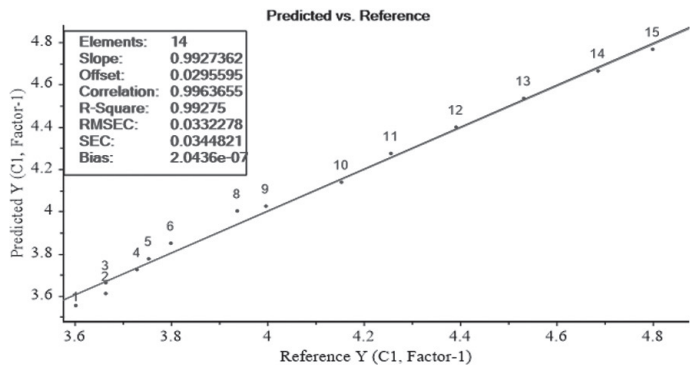


Figura 2.24 Modelo PLS para determinação da viscosidade a 25 °C de misturas de biodiesel de soja em diesel.

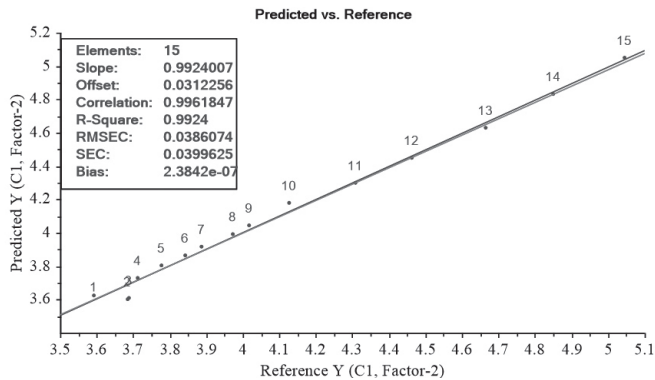


Figura 2.25 Modelo PLS para determinação da viscosidade a 25 °C de misturas de biodiesel de algodão em diesel.

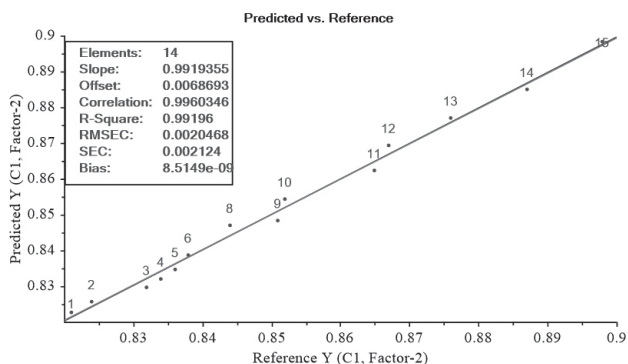


Figura 2.26 Modelo PLS para determinação da massa específica a 25 °C de misturas de biodiesel de soja em diesel.

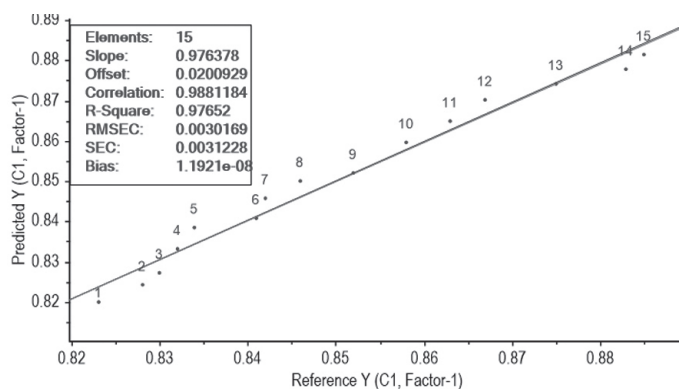


Figura 2.27 Modelo PLS para determinação massa específica a 25 °C de misturas de biodiesel de algodão em diesel.

Os modelos de calibração foram examinados a partir dos valores do coeficiente de determinação (R^2), que é definido como a percentagem de variabilidade em Y que pode ser atribuída à variabilidade em X, indicando a precisão do modelo para prever respostas a novas observações. Para misturas de biodiesel de soja e algodão em diesel, os modelos mostraram-se eficazes para prever mudanças na concentração com base em variações espectrais de fluorescência. Os valores de R^2 de 0,99892 e 0,99936 para as misturas de biodiesel de soja em diesel e biodiesel de algodão em diesel, respectivamente, demonstraram a eficácia dos modelos para prever as concentrações (figuras 2.22 e 2.23).

Os modelos de calibração multivariada (PLS) para determinação da viscosidade de misturas de biodiesel de soja em diesel e misturas de biodiesel

de algodão em diesel foram desenvolvidos usando os dados de fluorescência como as variáveis independentes para cada mistura de biodiesel e os valores de viscosidade como as variáveis dependentes (Tabela 2.8). As figuras 2.24 e 2.25 mostram que os respectivos modelos PLS foram eficazes, tendo em vista os valores de R^2 de 0,99275 e 0,9924 para as misturas de biodiesel de soja em diesel e biodiesel de algodão em diesel, respectivamente.

Modelos de calibração multivariada para a massa específica foram também desenvolvidos para as misturas de biodiesel de soja em diesel e misturas de biodiesel de algodão em diesel usando fluorescência como as variáveis independentes para cada tipo de biodiesel e os valores de massa específica como as variáveis dependentes (Tabela 2.8). As figuras 2.26 e 2.27 apresentam os modelos PLS para determinação da massa específica de misturas de biodiesel de soja em diesel ($R^2 = 0,99196$) e misturas de biodiesel de algodão ($R^2 = 0,97652$) em diesel, respectivamente. Os valores de R^2 próximos de 1 indicou a capacidade dos modelos PLS para prever com precisão a massa específica destas misturas.

2.7 POSSIBILIDADES INDUSTRIAIS

O método proposto tem as vantagens de permitir o monitoramento remoto *in loco* e em tempo real das alterações de tipo e composição de um processo de substâncias puras ou em formulações, por exemplo, a obtenção de combustíveis de um modo rápido, não destrutivo e não intrusivo. Tem ainda a vantagem competitiva de o custo analítico ser inferior ao de outras técnicas tradicionais e poder ser aplicado para identificação e determinação de propriedades físicas e químicas em substâncias puras, isoladas de produtos naturais ou sintetizadas em laboratórios, ou presentes em formulações, tais como em medicamentos ou em drogas ilícitas. Também pode ser aplicado para confirmar a identidade de substâncias utilizadas como matéria-prima na produção de biodieseis, alimentos e fármacos, assim como monitorar o respectivo processo de obtenção de substâncias e suas formulações como, por exemplo, biocombustível ou identidade de um fármaco ou de uma droga ilícita. Tem ainda a vantagem de dispensar as etapas de preparação da amostra quando medido *in situ*.

A tecnologia baseia-se em diversas patentes, e a empresa QUIMIS já está comercializando o primeiro equipamento de uma linha. Este é mais versátil e foca laboratórios de análises (QUIMIS, 2013). Estão em desenvolvimento protótipos para análises on-line e em tempo real, que devem chegar ao mercado nos próximos anos.

2.8 CONCLUSÕES

Faz parte da rotina nos laboratórios de pesquisa de produtos naturais, de síntese e na indústria farmacêutica o uso de técnicas espectroscópicas diversas para a elucidação estrutural de substâncias isoladas de produtos naturais ou resultantes de sínteses. A realização de todas as técnicas necessárias para elucidação estrutural de uma única substância resulta geralmente em consumo de tempo dos equipamentos, bem como do especialista para a interpretação dos espectros. Tratando-se de substâncias desconhecidas é imprescindível, para a determinação de suas estruturas, a utilização de técnicas espectroscópicas avançadas e a análise integrada dos vários tipos de espectros obtidos. Entretanto, a condição mais constante é o isolamento de substâncias com estruturas já conhecidas, mas, ainda assim, na maioria dos casos, a confirmação das estruturas é feita utilizando várias técnicas sofisticadas, resultando em gastos desnecessários de tempo e elevação dos custos.

Com o método proposto para a identificação e quantificação de substâncias, sejam elas puras sejam em formulações, pode-se ganhar tempo e economizar recursos financeiros, devido ao uso de técnicas mais simples e de menor custo, tais como, espectrofluorimetria e espectroscopia no UV-Vis associadas às técnicas quimiométricas.

2.9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos dados obtidos pelo método proposto, é possível a construção de equipamentos dedicados a análises específicas e de baixo custo para determinação de qualidade de outras propriedades de interesse em misturas das indústrias farmacêutica, alimentícia e de combustíveis. Outros óleos derivados de plantas ou do petróleo, como gasolina automotiva, querosene de aviação, óleo combustível, óleo lubrificante e óleos isolantes de transformadores, que são naturalmente fluorescentes, fármaco ou ainda pode ser usado pelos órgãos reguladores para certificar se determinado medicamento vendido não está adulterado. Outra possibilidade é o uso deste método para determinar propriedades de óleos vegetais para serem construídos para identificar drogas ilícitas ou suas adulterações, como por exemplo, do azeite de oliva extra-virgem em substâncias usadas em *dopping*.

REFERÊNCIAS

1. Hostettmann K, Marston A. The search for new drugs from higher plants. *Chimia*. 2007;61(6):322-6.
2. Quintella CM, Meira M, Araújo EMP, David JP, inventores. Método de identificação de substâncias, puras ou em formulações, através de análise espectral e quimiometria. Patente brasileira, protocolo número 011100001121, 2010.
3. Meira M, Quintella CM, Ferrer TM, Silva, HRG, Guimarães AK, Santos MA, Costa Neto PR, Pepe IM. Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3D e análise das componentes principais. *Química Nova*. 2011;34(4):621-4.
4. Araújo EMP. Técnicas espectroscópicas e quimiométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidas por síntese [Tese]. Salvador: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química; 2011.
5. Meira M, Quintella CM, Tanajura AD, da Silva HRG, Fernando JDS, Neto PRD, et al. Determination of the oxidation stability of biodiesel and oils by spectrofluorimetry and multivariate calibration. *Talanta*. 2011 Jul 15;85(1):430-4.
6. Meira M, Quintella CM, Pepe IM, Neto PRD, Tanajura AD, da Silva HRG. Prediction of properties of biodiesel-diesel blends using spectrofluorimetry and multivariate calibration. *Central European Journal of Chemistry*. 2012 Aug;10(4):1328-37.
7. Quintella CM, Meira M, Guimarães AK, Tanajura AS, Silva HRG. Prospecção tecnológica como uma ferramenta aplicada em ciência e tecnologia para se chegar à inovação. *Revista Virtual de Química*. 2011;3:406-15.
8. Quintella CM, Teixeira LSG, Korn MGA, Costa Neto PR, Torres EA, Castro MP, Jesus CAC. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Química Nova*. 2009; 32:793-808.
9. Jesus CAC, Korn MGA, Torres, EA, Quintella CM. Prospecção Tecnológica de Biodiesel. *Cadernos de Prospecção*. 2009; 2:21-5.
10. Sola MCR, Quintella CM. Desenvolvimento biotecnológico no âmbito da renorbio rede nordeste de biotecnologia. *Cadernos de Prospecção*. 2011;4:50-6.
11. Quintella CM, Costa Neto PR, Cruz RS, Almeida Neto JA, Miyazaki SF, Castro MP. Prospecção Tecnológica do Biodiesel no Estado da Bahia: Panorama Atual e Perspectivas na Geração e Apropriação de Conhecimento. *Bahia Análise & Dados*. 2009;18:581-91.
12. Tomazzoni G, Quintella CM, Pepe IM, Meira M, Okamura LA, Costa Neto PR. Prospecção do uso de clorofila como parâmetro de diferenciação da adição de óleo vegetal ao diesel em vez de biodiesel. *Cadernos de Prospecção*. 2013;6:199-207.
13. Luna S, Meira M, Quintella CM. Prospecção tecnológica de patentes para determinação de métodos utilizados para análise de matéria-prima na produção de biodiesel. *Cadernos de Prospecção*. 2012;5:159-67.

14. Tanajura AS, Meira M, Ribeiro EMO, Gonçalves HR, Quintella CM. Prospecção tecnológica de patentes relacionadas à avaliação da qualidade de óleos por técnicas de fluorescência. *Cadernos de Prospecção*. 2012;5:115-20.
15. Tanajura, AS, Meira M, Ribeiro EMO, Gonçalves HR, Quintella CM. Prospecção tecnológica sobre métodos para determinação da oxidação de óleos e biocombustíveis com ênfase em métodos óticos. *Cadernos de Prospecção*. 2012;5:141-51.
16. Ribeiro EMO, Quintella CM, Luna S, Braga JLS, Cerqueira GS. Prospecção tecnológica sobre processo de transesterificação com ênfase na produção de biodiesel. *Cadernos de Prospecção*. 2012;5:53-62.
17. Correa GA, Steven GJ, James BA, inventors. Conoco Inc, assignee. Method and apparatus for underwater detection of hydrocarbons. Patent PH17146, 1980 Dec 15; United States patent US 4434364, 1984 Feb 28.
18. Devial RM, Taylor PM, inventors. Bailey Meters Controls Ltd, assignee. Oil pollution monitoring and monitoring unit. United States patent US 4057721, 1977 Nov 08.
19. Wang HY, Hui QS, Xu LX, Jiang JG, Sun Y. Fluorimetric determination of dopamine in pharmaceutical products and urine using ethylene diamine as the fluorogenic reagent. *Analytica Chimica Acta*. 2003 Nov 14;497(1-2):93-9.
20. Changchuan G, Lang A, Wang L, Jiang W. The co-luminescence effect of a europium (III)–lanthanum (III)–gatifloxacin–sodium dodecylbenzene sulfonate system and its application for the determination of trace amount of europium (III). *Journal of Luminescence*. 2010;130:591-7.
21. Sahiner N, Singh M. In situ micro/nano-hydrogel synthesis from acrylamide derivatives with lecithin organogel system. *Polymer*. 2007 May 4;48(10):2827-34.
22. Januszkiewicz KR, Berkmesian G, Sulek HH. UV-fluorescence spectroscopic method for monitoring tramp oil contamination in hot rolling emulsions. II: Application of fluorescent tracers. *Annual meeting Lubrication Engineering*. 1992;48:56-61.
23. Xu H, Liu QW. Spectroscopy characterization of anthracene in SDS/BA/H₂O system. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008 Jul;70(2):243-6.
24. Bages S, Descales B, Lambert D, Liinas J, Martens A, Osta S, Sanchez M, inventors. Bp Chem Int Ltd; Bp Oil Int, assignees. Property determination. Patent ZA9508457, 1997 Apr 07.
25. Clark D, Crockett MI, Dicesare JL, Mccaffrey JT, inventors. Neogen Corp, assignee. Apparatus and methods for chemiluminescent assays. United States patent US 2003186458, 2003.
26. Vinjamoori DV, inventor. Monsanto Technology Llc, assignee. Methods for determining oils in seeds. Patent MX PA02003063, 2002.

27. Alvarez JG, Modell M, inventors. Beth Israel Deaconess Medical Center, assignee. Method for determining a level of oxidative stress of a tissue sample. United States patent US 5912179, 1998 Jan 26.
28. Quintella CM, Guimarães AK, Musse APS, inventores. Método para monitorar qualidade em processos de obtenção de combustíveis e dispositivo sensor para sua operação. Patente BR 0900078, 2009; patente WO 2010BR00016, 2009.
29. Quintella CM, Meira M, Costa Neto PR, Gonçalves HR, Tanajura AS, inventores. Método para prever propriedades químicas e físico-químicas de óleos através de análise multivariada associada com espectrofluorimetria. Patente brasileira BR 11100001114, 2010.
30. Ito JA. Técnicas espectroscópicas em Biofísica. Caderno de Física da UEFS. 2004; 03:21-9.
31. Vogel AI. Análise Química Quantitativa. 6a ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos; 2002.
32. Feng SL, Wang J, Chen XG, Fan J. Kinetic spectrofluorimetric determination of trace ascorbic acid based on its inhibition on the oxidation of pyronine Y by nitrite. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005 Mar;61(5):841-4.
33. Song Z, Zhang N. In vitro detecting ultra-trace novalgin in medicine and human urine by chemiluminescence. *Talanta*. 2003 May 28;60(1):161-70.
34. Chen GY, Schneider MJ, Darwish AM, Lehotay SJ, Freeman DW. Europium-sensitized luminescence determination of oxytetracycline in catfish muscle. *Talanta*. 2004 Sep 8;64(1):252-7.
35. Schneider MJ. Rapid fluorescence screening assay for enrofloxacin and tetracyclines in chicken muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004 Dec 29;52(26):7809-13.
36. Sotomayor MDPT, Dias ILT, Lanza MRV, Moreira AB, Kubota LT. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova*. 2008;31:1755-74.
37. Soper SA, McGown LB, Warner IM. Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry. *Anal Chem*. 1994;66: 428R-444R.
38. Murata Y, Matsui H, Hirano KI, Kondo Y, Yanaka A, Nakahara A, Tanaka N, Muto H. Autofluorescence in indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *J. Gastroenterology*. 2000;35: 510-7.
39. Arancibia JA, Escandar GM. Two different strategies for the fluorimetric determination of piroxicam in serum. *Talanta*. 2003 Aug 29;60(6):1113-21.
40. Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Tomás V, Martín J. Flow injection determination of vitamin K3 by a photoinduced chemiluminescent reaction. *Analyst*. 1999;124:197-201.

41. Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Tomas V, Fenol J. Fluorimetric determination of total ascorbic acid by a stopped-now mixing technique. *Analyst*. 2001 Aug;126(8):1436-9.
42. Al-Ghannam SM, El-Brashy AM, Al-Farhan BS. Fluorimetric determination of some thiol compounds in their dosage forms. *Farmaco*. 2002 Aug;57(8):625-9.
43. Suarez-Rodriguez JL, Diaz-Garcia ME. Fluorescent competitive flow-through assay for chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Biosensors & Bioelectronics*. 2001 Dec;16(9-12):955-61.
44. Ramesh KC, Gowda BG, Seetharamappa J, Keshavayya J. Indirect spectrofluorimetric determination of piroxicam and propranolol hydrochloride in bulk and pharmaceutical preparations. *Journal of Analytical Chemistry*. 2003 Oct;58(10):933-6.
45. Quimis [Cited 2016 Dec 4]. Available from: <http://www.quimis.com.br/produtos.php?cat=4&sub=19&prod=319>.
46. Quintella CM, Meira M, Silva HRG Silva, Guimarães AK, Ferrer TM, Santos MA, Luna S, Cid ALD, Simões Jr LC, Tanajura AS, Filardi VL, Silva CET, Pepe IM, inventores. Protótipo de fluorímetro de LED associado a um software estatístico embarcado para classificação de amostras e predição de propriedades químicas e físico-químicas. Patente brasileira PI 011110000662, 2011.
47. Skoog DA, Holler FJ, Nienam TA. Princípios de análise instrumental. 5a ed. Porto Alegre: Bookman; 2002. 1024p.
48. Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7a ed. Rio de Janeiro: Editora LTC; 2006.
49. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia. 1a ed. São Paulo: Cengage Learning; 2010. 716p.
50. Vinadé MEC, Vinadé ERC. Métodos espectroscópicos de análise quantitativa. 1a ed. Santa Maria: UFSM; 2005. 272p.
51. Sena MM, Poppi RJ, Frighetto RTS, Valarini PJ. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos. *Química Nova*. 2000;23:547-56.
52. Ferreira MMC, Antunes AM, Melgo MS, Volpe PLO. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*. 1999;22:724-31.
53. Ferreira EC, Rodrigues SHBG, Ferreira MMC, Nóbrega JA, Nogueira ARA. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. *Eclética Química*. 2002;27:77-90.
54. Ferreira SLC, Bruns RE, da Silva EGP, dos Santos WNL, Quintella CM, David JM, et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*. 2007 Jul 27;1158(1-2):2-14.
55. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. 25 anos de Quimiometria no Brasil. *Química Nova*. 2006;29:1401-6.

56. Samistraro G, Muniz GIB, Peralta-Zamora P, Cordeiro GA. Previsão das Propriedades Físicas do Papel Kraft por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais. *Química Nova*. 2009;32:1422-5.
57. Forina M, Lanteri S, Casale M. Multivariate calibration. *Journal of Chromatography A*. 2007;1158:61-93.
58. Ferreira SLC, dos Santos WNL, Quintella CM, Neto BB, Bosque-Sendra JA. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry – Review. *Talanta*. 2004 Jul 8;63(4):1061-7.
59. Pimentel MF, Galvão RKH, Araújo MCU. Recomendações para calibração em Química Analítica parte 2: calibração multianálito. *Química Nova*. 2008;31:462-7.
60. Meira M, Quintella CM, Ribeiro EMO, Guimarães AK, Santos MA, Cerqueira GS, Cid ALD, Luna S, Silva WL. Prediction of Concentration of Animal Fat in Mixture with Vegetable Oil by Multivariate Calibration Associated with Spectrofluorimetry. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2013;4:99-103.
61. Smith AFM, Verdinelli I. Uma nota sobre Designs Bayes para Inferência utilizando um modelo hierárquico linear. *Biometrika*. 1980;67:613-9.
62. Quintella CM, Meira M, Santos MA, Luna S, Silva WL, Monte MO, Diógenes Filho RG, Araújo ALC, Silva Junior ET, Guimarães GF, inventores. Aparelho e Método para Determinação de Acetileno em Óleos por Calibração Multivariada. Patente brasileira BRPI1020120335239, 2012.
63. Castro MTPO, Bahia UF, Quintella CM, Teixeira AP, Oliveira EBS, Pepe IM, inventores. Método Para Monitorar Degradação Estrutural e Falhas em Materiais e Dispositivo Sensor. Patente WO 2011088539 A1, 2010.
64. Panero FS, da Silva HEB. Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil. *Microchemical Journal*. 2008 Apr;88(2):194-200.
65. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. *Chemometrics: a practical guide*. 1a ed. New York: John Wiley & Sons; 1997.
66. Correia PRM, Ferreira MMC. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*. 2007;30:481-7.
67. Booksh KE, Kowalski B. Theory of analytical chemistry. *Analytical Chemistry*. 1994;66:782A-91A.
68. Barros Neto B, Pimentel MF, Araújo MCU. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*. 2002;25:856-65.
69. Saldanha TCB, Araújo MC, Barros Neto B. Simultaneous multicomponent analysis by UV-Vis spectrophotometry. *Química Nova*. 1999;22:847-53.

70. Araújo MCU, Saldanha TCB, Galvao RKH, Yoneyama T, Chame HC, Visani V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001;57:65-73.
71. Quintella CM, Pepe IM, Meira M, Gonçalves HR, Guimarães AK, Ferrer TM, Santos MA, Costa Neto PR, inventores. Método de identificação de amostras de óleos através de análise espectral e quimiometria. Patente PI221106730261, 2011.
72. Quintella CM, Meira M, Silva WL, Filho RGD, Araujo ALC, Junior ETS, et al. Development of a spectrofluorimetry-based device for determining the acetylene content in the oils of power transformers. *Talanta*. 2013 Dec 15;117:263-7.
73. Quintella CM, Meira M, Santos MA, Luna S, Silva WL, Monte MO, Diógenes Filho RG, Araújo ALC, Silva Junior ET, Guimarães GF, inventores. Dispositivo Sensor e Processo para Determinar a Soma das Concentrações dos Gases Combustíveis em Óleos Isolantes. Patente brasileira BRPI1020120335271, 2012.
74. Quintella CM, Meira M, Santos MA, Luna S, Silva WL, Monte MO, Diógenes Filho RG, Araújo ALC, Silva Junior ET, Guimarães GF, inventores. Método e Aparelho para Avaliar a Degradação de Papel Isolante em Transformadores de Potência. Patente brasileira BRPI1020120335247, 2012.
75. Gonçalves HR, Cid ALD, Tanajura AS, Miyazaki SF, Meira M, Quintella CM. Prospecção tecnológica de patentes para determinação de massa específica e viscosidade de óleos, biocombustíveis e combustíveis por métodos óticos. *Cadernos de Prospecção*. 2011;4:12-22.
76. Tomazzoni G, Meira M, Quintella CM, Zagonel GF, Costa BJ, Oliveira PR, Pepe IM, Costa Neto PR. Identification of vegetable oil or biodiesel added to diesel using fluorescence spectroscopy and principal component analysis. *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 2014;91:215-27.
77. Costa Neto PR, Tomazzoni G, Quintella CM, Fontana JD, Pepe IM, inventores. Método para Determinação da Adulteração de Óleo Diesel por Óleos Vegetais in Natura e Alternativamente Óleos Vegetais Residuais. Patente brasileira BR 1020120320215, 2012.

SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS E SUAS APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

Cláudio Nahum Alves
Jerônimo Lameira Silva
José Rogério de Araújo Silva

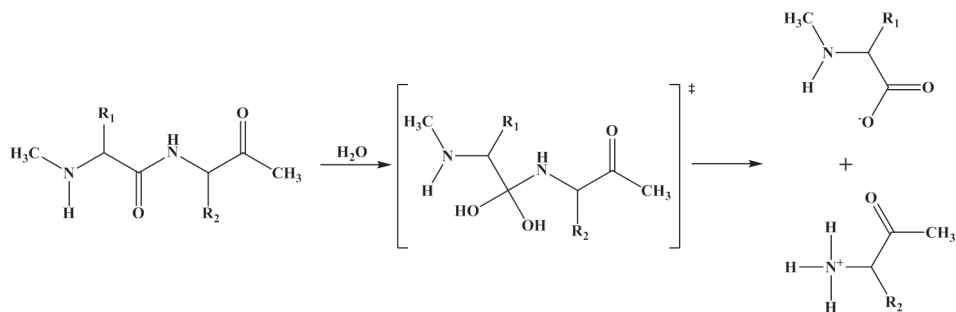
3.1 INTRODUÇÃO

O entendimento de reações enzimáticas em nível atômico é um dos maiores desafios para a biofísica moderna¹. Técnicas experimentais como a difração de raios X e engenharia genética têm proporcionado um grande progresso na determinação estrutural de enzimas. Entretanto, tais técnicas não são capazes de explicar a origem do poder catalítico enzimático¹. Informações mais detalhadas sobre reações enzimáticas podem ser obtidas através dos métodos de química computacional, química teórica e modelagem molecular¹, os quais estão se tornando cada vez mais importantes para o entendimento do papel biológico das enzimas, bem como para a área da biotecnologia². Usando tais métodos, pode-se, por exemplo, propor estruturas de novas enzimas com importância industrial e médica², ou se pode ainda propor bioligantes ou

inibidores de alvos terapêuticos². O desenvolvimento de métodos de cálculos, bem como os novos algoritmos matemáticos, muito mais efetivos, acompanhados do impressionante avanço de *software* e *hardware*, permitiu à modelagem molecular passar do estudo de pequenos sistemas em fase gasosa para explorar, calcular e caracterizar as propriedades de sistemas complexos como os enzimáticos. Os pioneiros na área de simulações computacionais enzimáticas, Martin Karplus, Michael Levitt e Arieh Warshel, foram contemplados com o prêmio Nobel de Química de 2013 pelo desenvolvimento de modelos multiescala para sistemas químicos complexos, o que ressalta a importância científica do tema abordado neste capítulo.

A principal corrente de pensamento para explicar a reatividade química e, em particular, a catálise enzimática, tem suas origens na ideia singular de Linus Pauling³ o qual teve grande importância na área de química e bioquímica e, curiosamente, foi orientador de Martin Karplus (já citado) no Departamento de Química da Caltech (Instituto de Tecnologia da Califórnia). Segundo Pauling³, as enzimas acelerariam as reações químicas ao estabilizar o estado de transição (ET) com relação ao complexo de Michaelis. A evidência experimental que confirma essa hipótese é o fato de que compostos semelhantes ao ET, análogos ao estado de transição, que abreviaremos aqui como AET, são inibidores competitivos das enzimas, e dessa forma podem ser usados como fármacos⁴. Uma proposta geral dessa ideia é apresentada na Figura 3.1. Como exemplo de molécula desenhada com esse propósito, tem-se o Saquinavir, que foi o primeiro medicamento desenvolvido para inibir a enzima aspártica protease do HIV. Esse inibidor foi desenhado como AET do substrato dessa enzima. Assim, estabelecendo-se a natureza do ET, pode-se propor a síntese de moléculas com geometria e propriedades físico-químicas semelhantes, mas com estruturas estáveis⁴.

O uso de enzimas para produção de alimentos, tecidos, fármacos e biocombustível está bem estabelecido⁵. Milhões de anos foram necessários para criar poderosos biocatalisadores capazes de acelerar uma enorme variedade de reações químicas, mantendo a regioseletividade e a estereosseletividade. Entretanto, os químicos sintéticos estão criando cada vez mais compostos artificiais e novas reações, nas quais não existem enzimas naturais, para realizar a biocatálise. Dessa maneira, o desenho de enzimas capazes de catalisar tais reações tornou-se um dos maiores desafios em biotecnologia⁵. Baseando-se na ideia de Linus Pauling³, Jencks⁶ propôs empregar os AETs como antígenos em sistemas vivos para gerar anticorpos catalíticos (ACs). Os estudos dos processos associados à atividade dos ACs propiciam uma oportunidade sem igual para entender a catálise enzimática e para melhorar



Estrutura Análoga ao Estado de Transição

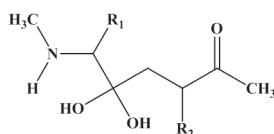


Figura 3.1 Representação esquemática de mecanismo reacional.

a estrutura de novos catalisadores². É importante ressaltar que os ACs serão particularmente interessantes nas reações químicas nas quais não há enzimas conhecidas que as catalisem.

Este capítulo abordará os métodos mais utilizados em simulação de reações enzimáticas. Em seguida, serão apresentadas duas aplicações dos métodos apresentados aqui, sendo a primeira um trabalho publicado pelos autores deste capítulo no qual se mostra a possibilidade de usar o mecanismo molecular enzimático como ponto de partida para determinação de inibidores AETs, enquanto a segunda mostrará como o conhecimento da ET pode ajudar no desenho de anticorpos catalíticos.

3.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.2.1 Métodos híbridos: mecânica quântica/mecânica molecular (MQ/MM)

Em 1976, Warshel e Levitt apresentaram uma nova metodologia baseada em hamiltonianos híbridos, que hoje é considerada essencial para o estudo de reações enzimáticas^{7,8}. A essa metodologia foi dado o nome de método de

mecânica quântica combinado com mecânica molecular (QM/MM), do inglês *combined quantum-mechanics/molecular-mechanics*^{7,8}. Nesse método realiza-se a partição do sistema em dois subsistemas: um contendo as moléculas que participam de forma ativa na reação química (rupturas e formações de ligações químicas) e outro englobando as demais moléculas presentes no sistema (meio ou entorno), que desempenham um papel passivo numa determinada reação química. A vantagem inerente de tal partição é que cada subsistema é tratado com o emprego de um método distinto, destinando o mais rigoroso à descrição do processo de reação e o mais simples à descrição das centenas ou milhares de moléculas que descrevem o meio em que ocorre a reação⁷.

O método usado para descrever adequadamente a molécula que participa de forma ativa da reação química é conhecido como método mecânico quântico (MQ), do inglês *quantum-mechanics*, e o método usado para descrever o meio é chamado de mecânica molecular (MM), do inglês *molecular-mechanics*, que é um método clássico baseado na aplicação de campo de forças, o que permite realizar rapidamente os cálculos com baixo custo computacional. Por outro lado, por não resolver a equação de Schrödinger, os métodos de mecânica molecular não podem ser aplicados a sistemas que impliquem a ruptura ou formação de uma ligação química, além de não descreverem adequadamente as interações eletrostáticas devido aos efeitos de polarização⁹⁻¹².

Devido ao impressionante avanço no desenvolvimento de *software* e *hardware*, o estudo teórico de sistemas compostos por um elevado número de átomos, como é o caso das enzimas, tem se tornado possível. Há uma crescente aplicação do método de mecânica quântica combinado com mecânica molecular (MQ/MM) no estudo de problemas de natureza química e biológica relacionados a enzimas, especialmente em catálise enzimática⁹⁻¹⁸. Uma pesquisa básica no ISI Web of Science usando como palavra-chave “QM/MM”, apesar de não refletir todos os trabalhos dessa área, mostra um aumento no número de publicações a esse respeito em poucos anos (Figura 3.2).

Como já comentado acima, no método de mecânica quântica combinado com mecânica molecular (MQ/MM) o sistema completo divide-se em dois subsistemas, MQ e MM (Figura 3.3), e cada subsistema recebe tratamento distinto. O subsistema MQ é compreendido por aquelas moléculas que participam da reação química, sendo descrito por métodos quânticos, tais como *ab initio*, ou semiempíricos, como os métodos AM1¹⁹ e PM3²⁰, entre outros. O subsistema MM corresponde ao meio (proteína e moléculas de água) e é descrito por campos de força, sendo os mais usados os seguintes: *assisted model building with energy refinement* (AMBER)^{21,22}, *chemistry at*



Figura 3.2 Representação das recentes publicações relacionadas ao método MQ/MM.

HARvard macromolecular mechanics (CHARMM)²³, *Groningen molecular simulation* (GROMOS)²⁴ e *optimized potentials for liquid simulations – all atoms* (OPLS-AA)²⁵. Geralmente esses campos de força incluem parâmetros para proteínas e ácidos nucleicos, mas alguns deles possuem parâmetros para lipídeos e carboidratos. Em suma, os métodos híbridos MQ/MM permitem incluir tanto a precisão de um tratamento quântico como a eficiência computacional da mecânica molecular.

A região MQ inclui todos os átomos envolvidos diretamente na reação química, ou seja, os átomos que participam da formação e rupturas das ligações. Os átomos dessa região são representados como elétrons e núcleos,

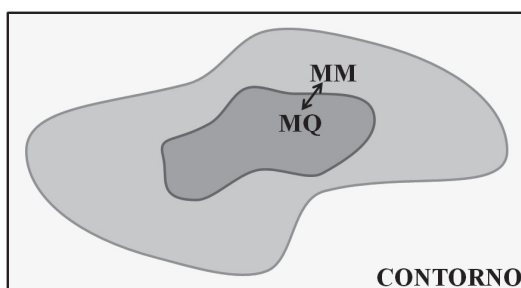


Figura 3.3 Partição do sistema MQ/MM.

e as superfícies de potencial associadas a eles são determinadas pela aproximação de Born-Oppenheimer²⁶, de modo que a energia é descrita em função

das posições dos núcleos. Por outro lado, a zona MM contém o resto dos átomos do sistema. Estes são descritos classicamente, e suas interações são determinadas mediante funções de energia potencial empírica, de modo que esses átomos não podem estar envolvidos no processo de formações ou ruptura de ligações. Os átomos MM interagem com os átomos MQ envolvidos na reação, de modo que seus movimentos e interações influem sobre os átomos MQ, e vice-versa.

A função de onda do subsistema MQ dependerá das coordenadas dos elétrons dos átomos (\vec{r}_i) e, parametricamente, dos núcleos que a formam (\vec{r}_α) e da posição do centro que formam o entorno (\vec{r}_ω) (Figura 3.4):

$$(Equação 3.1) \quad \Phi = (\vec{r}_i); (\vec{r}_\alpha); (\vec{r}_\omega)$$

Tal função de onda proporciona ou descreve a densidade eletrônica da região quântica submetidas às interações correspondentes ao entorno. O hamiltoniano efetivo do sistema é definido como:

$$(Equação 3.2) \quad \hat{H}_{eff} = \hat{H}_{MQ} + \hat{H}_{MQ/MM} + \hat{H}_{MM}$$

em que \hat{H}_{MQ} corresponde ao hamiltoniano da região quântica, cuja expressão é equivalente à do subsistema dos reagentes em vazio, \hat{H}_{MM} corresponde às interações entre as moléculas que formam o entorno e $\hat{H}_{MQ/MM}$ descreve as interações entre as duas regiões e se decompõe em três termos, cada um deles com seu hamiltoniano correspondente: eletrostático, Van der Waals e de polarização.

$$(Equação 3.3) \quad \hat{H}_{MQ/MM} = \hat{H}_{MQ/MM}^{Elec} + \hat{H}_{MQ/MM}^{VdW} + \hat{H}_{MQ/MM}^{Pol}$$

O termo de polarização, $\hat{H}_{MQ/MM}^{Pol}$, estabelece um acoplamento entre a função de onda do sistema MQ e as cargas do entorno, o que deveria se resolver de modo autoconsistente. De maneira geral, costuma-se desprezar esse termo, de modo que se ignora a polarização instantânea que sofre o entorno, simplificando os cálculos. Dessa forma o hamiltoniano associado à interação de ambas as regiões é escrito em termos de coordenadas atômicas e se reduz a:

$$(Equação 3.4) \quad \hat{H}_{MQ/MM} = \sum_i \sum_\omega \frac{q_\omega}{r_{i\omega}} + \sum_\alpha \sum_\omega \frac{Z_\alpha q_\omega}{r_{\alpha\omega}} + \left[\frac{A_{\alpha\omega}}{r_{\alpha\omega}^{12}} - \frac{B_{\alpha\omega}}{r_{\alpha\omega}^6} \right]$$

O primeiro termo contém as coordenadas eletrônicas (\vec{r}_i), motivo pelo qual aparece em forma de integral de interação eletrônica entre os centros no ciclo do campo autoconsistente (do inglês, *self-consistent-field* – SCF).

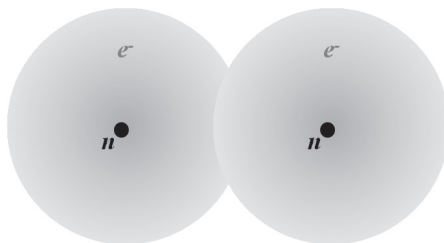


Figura 3.4 Descrição da função de onda do subsistema MQ, em que e- são os elétrons envolvidos no subsistema QM e H representa o núcleo atômico dos átomos envolvidos no subsistema QM.

3.2.2 Interação de não ligação

Há ocasiões em que não se pode desprezar o efeito polarizante que provocam algumas moléculas do meio (quando estão próximas às moléculas dos reagentes). Nessas ocasiões, essas moléculas devem ser incluídas no subsistema quântico. Essa solução, aparentemente simples no caso de se trabalhar em solução, pode não ser tão simples quando se trabalha com enzimas. No caso de proteínas em que os resíduos próximos atuam ativamente na reação, formando, por exemplo, ligação covalente com o substrato, não é possível uma partição nítida dos distintos subsistemas MQ e MM. Nesses casos, deve-se recorrer a algum tipo de aproximação que permita satisfazer as valências dos átomos quânticos que definem a ligação entre a região quântica e a região clássica, por onde se produzirá a divisão (ligação de fronteira). Podem-se usar os métodos baseados no formalismo do campo local autoconsistente (LSCF)^{27,28}, que excluem do cálculo SCF o orbital do átomo quântico que forma parte da ligação de fronteira, permanecendo congelado durante todo o processo de otimização (Figura 3.5a). Tanto os coeficientes que definem o orbital congelado como sua população eletrônica devem ser determinados previamente empregando cálculos quânticos de modelos reduzidos. Outros métodos são os que empregam átomos adicionais de união (*link atom*)^{9,29}. Nesses métodos, a valência dos átomos quânticos afetados

pelo corte é completada empregando átomos de união (que serão por sua vez incluídos no subsistema quântico), de modo que substituam a região MM da ligação de fronteira (Figura 3.5b). As características que devem apresentar os átomos de união não estão completamente estabelecidas, variando tanto sua natureza como o tipo de interação que são permitidas com o entorno clássico. No que diz respeito ao tipo de átomo, este deverá reproduzir com certa medida as propriedades (tanto eletrônica como espaciais) do grupo que substitui. Apesar disso, entre as distintas opções (como o uso de halogênios), o mais comum a ser empregado é o átomo de hidrogênio.

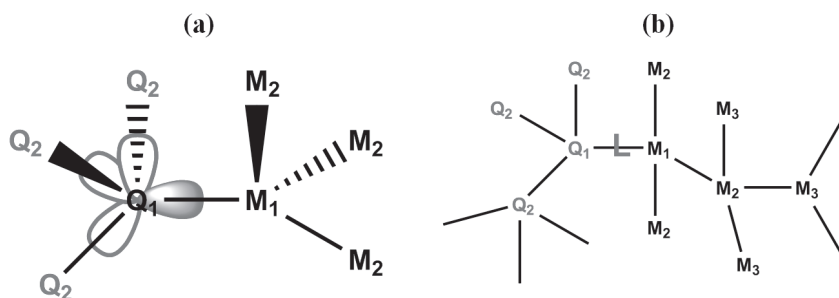


Figura 3.5 Representação dos métodos de complemento de valência. Este esquema localiza os orbitais híbridos da ligação e os mantém congelados. Dessa forma, eles completam a região QM, substituindo a ligação cortada.

3.2.3 Superfície de energia potencial

Para se estudar uma determinada reação enzimática, geralmente pode-se obter uma superfície de energia potencial (SEP) (Figura 3.6) que descreva as mudanças de certas coordenadas atômicas. As superfícies de energia potencial surgem no contexto da aproximação de Born-Oppenheimer, em que se realiza uma separação no tratamento da dinâmica dos núcleos e dos elétrons²⁶. Quando se aplica tal aproximação à equação de Schrödinger independente do tempo pode-se expressar a função de onda e energia como uma função paramétrica das posições dos núcleos. Dessa forma, para cada configuração nuclear se obtém uma solução para o sistema eletrônico, o qual depende das coordenadas do núcleo (\vec{r}_α e \vec{r}_ω). Ao variar tais coordenadas surge a superfície de energia potencial, uma vez que, resolvido o problema eletrônico, o cálculo da contribuição da energia potencial é imediato. A SEP uma vez obtida permite caracterizar cada espécie participante no processo

de reação (reativos, produtos, intermediários e estruturas de transição), bem como mostra possíveis caminhos de reação.

Tanto para analisar ou localizar os pontos estacionários sobre a superfície de energia potencial, é necessário conhecer o vetor gradiente (\vec{G}) e a matriz hessiana (H) da energia:

$$(Equação 3.5) \quad \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega}) = \mathcal{K}_{El}(r_i) + \mathcal{U}_{El}(r_i, r_{\alpha}, r_{\omega}) + \mathcal{U}_{Nuc}(r_{\alpha}, r_{\omega})$$

$$(Equação 3.6) \quad \vec{G} = \begin{pmatrix} \frac{\partial \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\alpha x}} \\ \dots \\ \frac{\partial \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\omega z}} \end{pmatrix} \quad H = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\alpha x}^2} & \dots & \frac{\partial^2 \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\omega z} \partial r_{\alpha x}} \\ \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial^2 \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\alpha x} \partial r_{\omega z}} & \dots & \frac{\partial^2 \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\omega z}^2} \end{pmatrix}$$

Todo ponto estacionário supõe um vetor gradiente nulo ($\vec{G} = \vec{0}$), enquanto a natureza do ponto estacionário está armazenada na matriz hessiana. Em função dos valores próprios da matriz hessiana, os pontos estacionários da SEP podem ser classificados como:

- Mínimos (ou de ordem zero): se possuem unicamente valores próprios positivos. Tal comportamento deve-se ao fato de que qualquer deslocamento que se realize sobre o ponto conduz a uma situação de maior energia. A esta categoria pertencem estruturas estáveis, como reagentes, intermediários e produtos de reação.
- Pontos de sela (ou primeira ordem): se caracterizam por apresentar um único valor próprio negativo, de modo que todas as possíveis modificações da geometria nuclear dão lugar a incremento da energia, exceto em uma direção que conecta o ponto com os mínimos associados. Esses pontos correspondem às estruturas de transição.

Tanto o vetor gradiente quanto a matriz hessiana, além de servirem como provas para caracterizar as estruturas obtidas, podem ser empregados também para localizar tais estruturas³⁰. A superfície de energia potencial está intimamente relacionada com o conceito de mecanismo de reação, uma vez que em toda reação química existe uma coordenada interna, ou combinação destas, que rege o trânsito entre as duas espécies, portanto, é possível representar a energia potencial unicamente em função de uma coordenada, denominada coordenada de reação. Assim se dispõe da maior quantidade de informação possível: a posição relativa das distintas estruturas localizadas (tanto a energia

como em termos geométricos) e o caminho como variação de coordenada de reação que as une, denominado caminho de reação. Além disso, as estruturas que definem o caminho de reação devem possuir um vetor gradiente cujas componentes devem ser nulas, exceto as que estejam associadas à própria coordenada de reação, ou seja, as geometrias dadas estão em situação de mínimo para todas as variáveis que formem parte da coordenada de reação. Em geral, costuma-se optar pela combinação de coordenadas internas que apresentam um maior peso³¹, denominando-se então coordenadas distinguidas.

3.2.4 Potencial de força média

Em geral, as simulações computacionais de reações químicas apresentam dois desafios: o primeiro é a descrição acurada das moléculas presentes no sistema e o segundo é amostragem estatística suficiente para assegurar que os resultados tenham relevância do ponto de vista termodinâmico^{32,33}. Para calcular propriedades termodinâmicas, é necessário um número muito grande de informações sobre os distintos estados acessíveis ao sistema. As simulações de dinâmica molecular (DM)³³⁻³⁷ e de Monte Carlo (MC)³⁸⁻³⁹ fornecem valiosas informações termodinâmicas e são empregadas para avaliar as distintas conformações de um sistema. Dessa forma, apesar das numerosas vantagens que oferece a exploração da superfície de energia potencial para reações em fase condensada, tanto em nível de mecanismo de reação como de caracterização de pontos estacionários, não é recomendável recorrer unicamente a essa técnica para estudar reações químicas. A razão baseia-se no efeito do meio: a presença de inúmeras conformações (ou estados) acessíveis, de baixo custo energético, se traduz no aumento da “rugosidade” na superfície de energia potencial. O efeito final é o agrupamento de pontos estacionários em família (unidos através dos correspondentes caminhos de reação), que se diferenciam principalmente em pequenas mudanças geométricas.

Portanto, em vez de obter somente a superfície de energia potencial, torna-se mais útil dispor de um observável de energia livre que dependa, por sua vez, da coordenada de reação. O potencial de força média (*potential of mean force* – PMF) se ajusta bem a essa definição:

$$\text{(Equação 3.7)} \quad PMF(\epsilon_0) \propto -\frac{1}{\beta} \ln \langle p(\epsilon_0) \rangle$$

em que $\langle p(\epsilon_0) \rangle$ corresponde à média da função de probabilidade para a coordenada de reação:

$$(Equação 3.8) \quad \langle p(\varepsilon_0) \rangle = \frac{\int \delta[\varepsilon_0 - \varepsilon(r)] e^{-\beta u(r)} dr}{\int e^{-\beta u(r)} dr}$$

O delta de Dirac na equação anterior assegura que unicamente leva-se em consideração a coordenada de reação elegida, ε_0 .

Um método para calcular o PMF foi descrito por Kumar e colaboradores em 1992⁴⁰. Nesse método, a função de distribuição de probabilidade se expressa com uma combinação de um número \mathcal{W} de funções de distribuição para distintos valores da coordenada de reação ($\varepsilon_{0,i=1,\mathcal{W}}$):

$$(Equação 3.9) \quad \langle p(\varepsilon_0) \rangle = \sum_i^{\mathcal{W}} c_i \langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle \left\{ \begin{array}{l} \sum_i^{\mathcal{W}} c_i = 1 \\ \langle p(\varepsilon_0)^2 \rangle - \langle p(\varepsilon_0) \rangle^2 \text{ Mínimo} \end{array} \right.$$

em que os coeficientes c_i são eleitos de modo a se minimizar o erro aleatório. As dinâmicas moleculares são realizadas com distintos valores de $\varepsilon_{0,i}$ (denominados janelas), de onde serão obtidas as correspondentes funções de distribuição $\langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle$ (ou histograma de frequência).

Neste ponto, o problema continua sendo a capacidade de exercer o controle sobre o processo de exploração das dinâmicas, uma vez que toda janela que tenha sua origem numa região que não corresponda a um mínimo evoluirá até estados de menor energia. Deve-se levar em consideração que, diferentemente da superfície de energia potencial, nas dinâmicas moleculares o sistema possui sempre uma quantidade de energia mínima, associada à existência de agitação térmica. Dentre os distintos métodos existentes, um dos mais empregados é denominado *umbrella sampling*. Essa técnica permite recuperar o valor de uma variável à qual foi aplicada uma restrição durante o processo de medida. Por exemplo, supondo que se pretende calcular o valor médio de uma variável, \mathcal{X} , o qual está definido por uma função de potencial determinada, $\mathcal{U}(r)$, é possível demonstrar que existe uma relação entre o valor médio, o qual é obtido – *denominando restrições* (“*biased*”) – aplicando uma função $\mathcal{V}_{Umb}(r)$ que restrinja algum aspecto do sistema:

(Equação 3.10)

$$\langle \mathcal{X} \rangle = \frac{\int \mathcal{X}(r) e^{-\beta u(r)} dr}{\int e^{-\beta u(r)} dr} = \frac{\int \frac{\mathcal{X}(r)}{\mathcal{V}_{Umb}(r)} \mathcal{V}_{Umb}(r) e^{-\beta u(r)} dr}{\int \mathcal{V}_{Umb}(r) e^{-\beta u(r)} dr} = \frac{\int \mathcal{V}_{Umb}(r) e^{-\beta u(r)} dr}{\int \frac{1}{\mathcal{V}_{Umb}(r)} \mathcal{V}_{Umb}(r) e^{-\beta u(r)} dr}$$

$$\langle \mathcal{X} \rangle = \frac{\langle \frac{\mathcal{X}(r)}{\mathcal{V}_{Umb}(r)} \rangle_{biased}}{\langle \frac{1}{\mathcal{V}_{Umb}(r)} \rangle_{biased}}$$

Dessa forma, sobre cada um desses intervalos (janelas) se aplica um potencial de “guarda-chuva” (“*umbrella*”), cuja única finalidade é evitar que se produzam desvios importantes no valor da coordenada interna:

$$(Equação 3.11) \quad \mathcal{V}_{Umb,i}(\varepsilon_{0,i}) = e^{\beta \frac{1}{2} K_{Umb,i} (\varepsilon_{0,i} - \varepsilon_{0,i}^{ref})^2}$$

Neste caso foi adotado um potencial tipo harmônico, caracterizado por uma constante de força $K_{Umb,i}$, e um valor de referência para coordenada de reação de uma determinada janela $\varepsilon_{0,i}^{ref}$. A definição de uma constante de força distinta para cada janela faz com que se intensifique o efeito da função nas zonas mais conflitantes (a região que envolve o estado de transição, por exemplo).

O seguinte passo é a construção da função de distribuição de probabilidade para cada uma das janelas, a partir dos dados obtidos durante a simulação:

$$(Equação 3.12) \quad \langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle = \frac{e^{-\frac{1}{2}\beta K_{Umb,i} (\varepsilon_{0,i} - \varepsilon_{0,i}^{ref})^2} \langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle}{\langle e^{-\frac{1}{2}\beta K_{Umb,i} (\varepsilon_{0,i} - \varepsilon_{0,i}^{ref})^2} \rangle}$$

Finalmente, ao gerar por combinação linear a função total de distribuição, os coeficientes c_i resultam dependentes do valor do PMF nas distintas janelas (PMF $(\varepsilon_{0,i})$).

$$(Equação 3.13) \quad \begin{cases} \langle p(\varepsilon_0) \rangle = \frac{\sum_i^{\mathcal{W}} n_i \langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle_{biased}}{\sum_j^{\mathcal{W}} n_j e^{-\beta(\mathcal{V}_{Umb,j} - PMF(\varepsilon_{0,j}))}} \\ e^{-\beta PMF(\varepsilon_{0,i})} = \int \text{caminho de reação} \langle p(\varepsilon_0) \rangle \mathcal{V}_{Umb,i}(\varepsilon_0) d\varepsilon_0 \end{cases}$$

em que $n_{i/j}$ representa o número de dados empregados para calcular a função de distribuição de probabilidade de uma determinada janela. Este acoplamento entre as distintas janelas resolve-se por interações de modo auto-consistente: inicialmente se determina um valor a todas as energias livres [PMF $(\varepsilon_{0,i})$] (usualmente zero), resolvendo-se a equação anterior, obtendo assim um conjunto de energias melhorado. O processo é então repetido com este novo grupo de valores e a interação segue até que sejam produzidas modificações tanto nas energias livres como na função de densidade total⁴¹.

3.2.5 Perturbação de energia livre

Outro método usado para prever a energia livre de reações enzimáticas, ou ainda a energia livre de ligação entre o ligante e a proteína, é o método de perturbação de energia livre (*free energy perturbation* – FEP)⁴². A FEP baseia-se na equação de Zwanzig (Equação 3.14), a qual expressa a energia livre como a diferença de energia potencial média entre um estado inicial (0) e um final (1), levando em consideração uma média de configurações. A diferença de energia livre, que acompanha a transformação entre um estado inicial (0) e um estado final (1), pode ser escrita como:

$$\text{(Equação 3.14)} \quad \Delta G(0 \rightarrow 1) = -k_B T \ln \langle \exp[-(E_1 - E_0)/k_B T] \rangle_0$$

em que k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, $E_1 - E_0$ é a diferença de energia entre os estados (0) e (1) e $\langle \dots \rangle_0$ indica a média de *ensemble* para o estado (0). O método FEP, quando combinado com dinâmica molecular, pode ser usado para estudar a interação enzima-inibidor e o mecanismo de reação.

3.3 APLICAÇÕES

3.3.1 Mecanismo enzimático molecular como ponto de partida para o desenvolvimento de inibidores análogos ao estado de transição

A teoria do estado de transição foi desenvolvida por Henry Eyring em 1935⁴³, o que provavelmente foi uma das maiores contribuições para química no século XX. Tal teoria foi desenvolvida de acordo com os princípios da termodinâmica, cinética e mecânica estatística⁴⁴. Eyring tomou como base a ideia de que as forças entre os átomos resultam de movimentos e distribuição dos elétrons e devem ser calculadas com base na mecânica quântica. Entretanto, pode-se assumir que o movimento dos núcleos dos átomos pode ser tratado de acordo com a mecânica clássica; assim, torna-se possível calcular constantes cinéticas de reação através da mecânica estatística⁴³.

O estado de transição (ET) pode ser definido como um grupo instável de átomos, em que ligações químicas podem ser formadas ou quebradas levando à formação do produto ou do reagente, em que energeticamente o

ET é o ponto na coordenada de reação de maior valor de energia. Um grupo de átomos pode se organizar de infinitas maneiras, seguindo diferentes caminhos. Se a energia do sistema (grupo de átomos) para os estados quânticos de menor energia for plotada em função das distâncias entre os núcleos, obtém-se uma superfície de energia potencial que descreve o movimento dos núcleos (Figura 3.6), na qual se pode observar diferentes caminhos de reação, em que as regiões de menor energia na superfície correspondem às moléculas que são separadas por baixas barreias de energia (Figura 3.6). Uma reação consiste em um sistema passando de uma região de menor energia para outra na superfície⁴³, onde o complexo ativado ou estado de transição corresponde ao ponto mais alto ao longo do caminho de menor energia (Figura 3.6). À luz da mecânica estatística, o estado de transição é definido como o ponto no qual a energia de formação ou quebra de ligação tem igual probabilidade de conduzir o ET ao produto ou ao reagente.

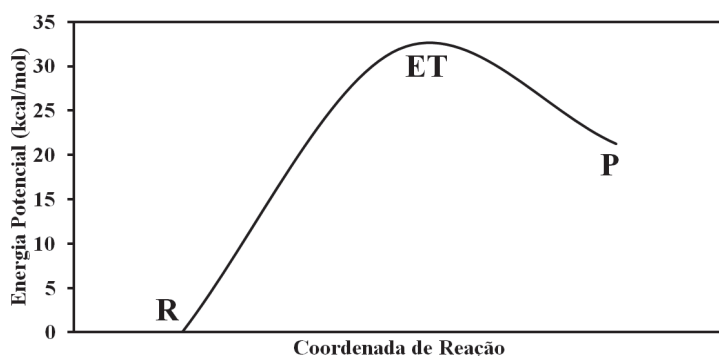


Figura 3.6 Representação esquemática de uma superfície de energia potencial.

A maior aplicação do estado de transição enzimático envolve o desenho de análogos ao ET, uma vez que esses análogos podem formar ligações com as enzimas milhões de vezes mais forte do que o substrato natural, o que torna a pesquisa nessa área promissora para o desenvolvimento de fármacos. Finalmente, podemos definir como análogos ao ET estruturas químicas que imitam características geométricas e propriedades físico-químicas do ET.

Nesta seção serão apresentados resultados de uma pesquisa desenvolvida recentemente por alguns dos autores deste capítulo, que trata do estudo do mecanismo catalítico da enzima hOGA envolvendo o substrato O-GlcNac, fazendo uso de métodos híbridos MQ/MM, SEP e PMF.

3.3.1.1 Alvo estudado

A reação estudada ocorre em quase todas as células eucarióticas em que algumas proteínas são glicosiladas. Nessa reação está envolvido o sacarídeo *N*-acetil- β -glicosamina, conhecido também como O-GlcNac, que se liga aos resíduos de serina e treonina de glicoproteínas através de grupos hidroxilas. A enzima que atua na hidrólise do O-GlcNac (Figura 3.7) no corpo humano é chamada de O-GlcNacase humana (hOGA), que é um membro da família 84 glicosídeo hidrolase (GH 84)⁴⁵. Alguns estudos mostram que hOGA usa um mecanismo envolvendo o grupo alfa-acetamido do substrato O-GlcNac para realizar a clivagem de tal substrato a partir de resíduos de serina ou treonina de proteínas modificadas após a etapa de tradução^{46,47}. A reação inicia com um aspartato atuando como doador de próton e outro como receptor, o que favorece o ataque nucleofílico do oxigênio grupo carbonílico do substrato sobre o carbono do centro anomérico, levando à formação de um intermediário biciclo oxazolina, como mostrado na Figura 3.7⁴⁸. No

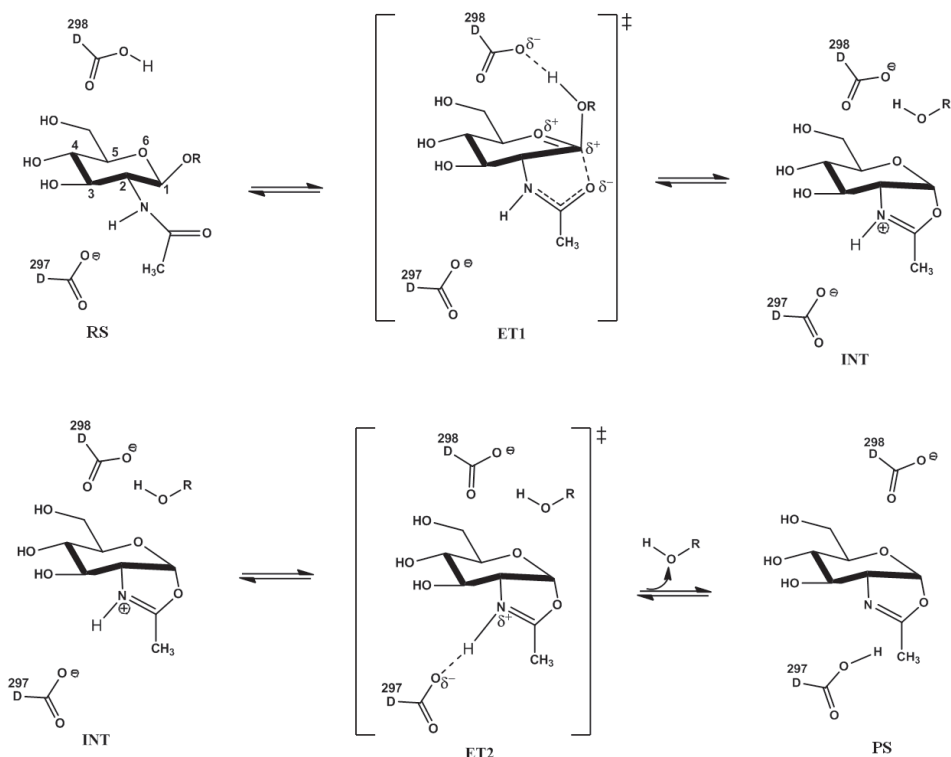


Figura 3.7 Representação esquemática do mecanismo proposto experimentalmente.

segundo passo da reação ocorre a abertura do ciclo formado. A ruptura do intermediário oxazolina é provocada via ataque de uma molécula de água (que atua como uma base) sobre o centro anomérico. Pela Figura 3.7 pode-se observar que a reação global ocorre em dois planos ordenados, cada um envolvendo inversão estereoquímica no centro anomérico, sendo que a reação global ocorre com a retenção estereoquímica⁴⁹. O desenvolvimento racional de inibidores de hOGA vem sendo um tópico importante de pesquisa durante anos, e tal interesse deve-se ao fato de que esses inibidores são promissores agentes terapêuticos que podem ajudar no combate de doenças neurodegenerativas, câncer e diabetes tipo II⁵⁰⁻⁵⁵.

3.3.1.2 Métodos

A estrutura de partida foi obtida no banco de dados de proteínas (Protein Data Bank – PDB) com o código (2CBJ)⁵⁶, em que o substrato foi desenhado usando as mesmas coordenadas do inibidor (PUGNAc) complexado à estrutura da proteína. O pKa foi calculado para os distintos estados de protonação dos resíduos ionizáveis (ASP, GLU, HIS, TYR e LYS) usando o servidor *propKa*⁵⁷. Em seguida, átomos de hidrogênios foram adicionados à estrutura da proteína considerando o estado de protonação dos aminoácidos a um pH 7. Por conseguinte, a enzima foi colocada em uma caixa cúbica (80 Å de lado) de água com moléculas TIP3P, tendo como centro de massa o substrato. Para reduzir o tempo de cálculo computacional, todos os resíduos que estavam a uma distância maior do que 20 Å do centro de massa foram congelados. O substrato foi descrito pelo método semiempírico AM1¹⁹, estando, portanto, dentro da região MQ. Os aspartatos 297 e 298 foram incluídos na região MQ (Figura 3.8a), o restante do sistema foi tratado com campo de força OPLS-AA. O sistema estudado apresentou um total de 23.465 átomos e 5.346 resíduos. O número de átomos móveis corresponde a 4.224, enquanto o número de átomos fixos corresponde a 19.247. No total, foram realizados 1,1 ns de dinâmica molecular (DM) através dos algoritmos Langevin-Verlet considerando uma temperatura de 300 K.

A energia livre associada à transferência de próton e à formação do ciclo foi determinada usando PMF obtido através do método WHAM³⁶, do inglês, *weighted histogram analysis method*, o qual traduzimos como método de análise de histogramas ponderados. Esse método foi combinado com *umbrella sampling*⁵⁸ seguindo a implementação da biblioteca fDynamo⁵⁹, usada para realizar todas as simulações descritas aqui. Como já comentado

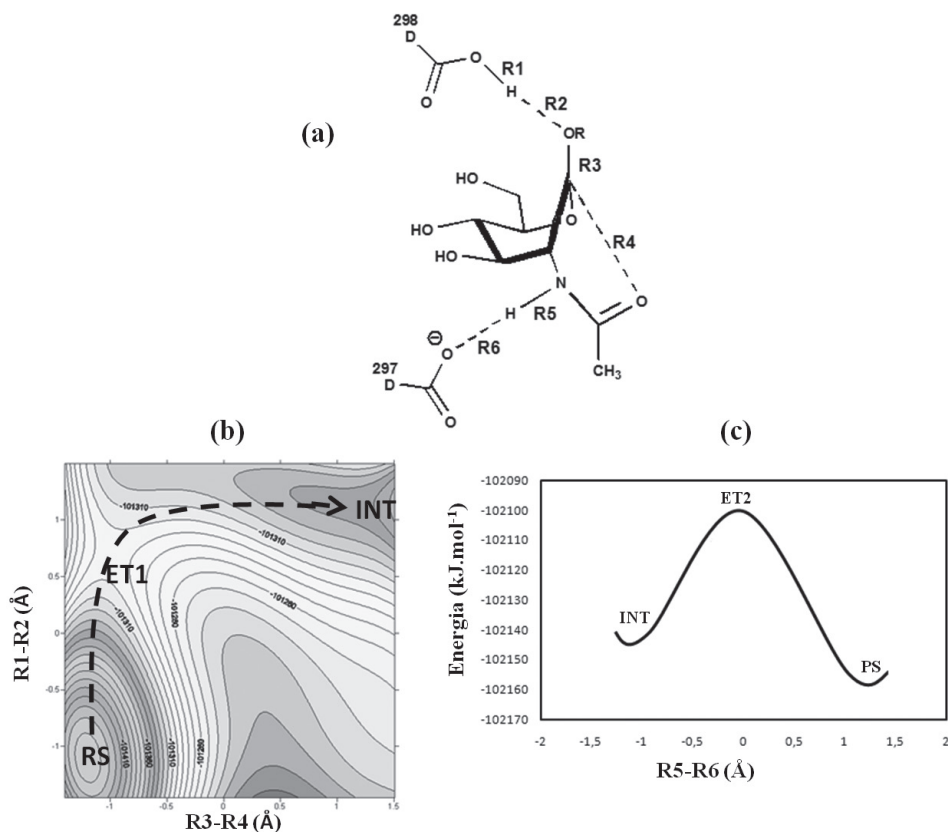


Figura 3.8 Resultados obtidos. (a) Coordenadas de reação utilizadas; (b) SEP-2D; (c) PMF.

na Seção 3.2, de fundamentação teórica, a realização do PMF requer uma série de simulações de dinâmica molecular na qual uma coordenada de reação é fixada em torno de um determinado valor, sendo que foi gerado um total de 39 simulações. Para cada simulação foi realizado 5,0 ps de relaxamento seguido de 10,0 ps de produção usando passos de 0,5 fs.

O uso de hamiltonianos *ab initio* é muito limitado quando se aplicam métodos híbridos MQ/MM. A forma mais viável do ponto de vista do tempo computacional é usar hamiltonianos semiempíricos, que são menos acurados. Uma das alternativas para inclusão de tratamento *ab initio* em cálculos MQ/MM é o uso da paradinâmica (PD)^{60,61}, que fornece uma maneira eficiente de incluir um tratamento *ab initio* nos cálculos de energia livre usando os métodos MQ/MM. O ponto de partida para se aplicar PD é usar um potencial de referência, por exemplo, os métodos empíricos de ligação

de valência (*empirical valence bond* – EVB)⁶¹, e a partir desse potencial de referência aplicam-se perturbações que permitem a determinação de um potencial *ab initio* para descrever o perfil de uma determinada reação em fase condensada⁶¹. A alternativa para incluir o tratamento *ab initio* na descrição de reações de fase condensada através de MQ/MM é usar correções interpoladas propostas por Truhlar⁶² e implementadas por Ruiz-Penia⁶³. No exemplo mostrado aqui, optamos por esta última para incluir as correções *ab initio* nas simulações MQ/MM, a fim de evitar as parametrizações exigidas pelo método EVB. O hamiltoniano Austin model 1 (AM1) foi usado para descrever a região MQ na construção das SEPs e PMF 2D e, em seguida, as correções foram feitas em nível B3LYP/6-31(d) usando estruturas obtidas com o método AM1/MM. Mais detalhes podem ser encontrados nas referências⁶³⁻⁶⁷.

3.3.1.3 Resultados e discussão

SEP e PMF

Para estudar o mecanismo de reação em questão, foram geradas diferentes superfícies de energia potencial (SEP) usando combinações das distâncias mostradas na Figura 3.8a. As superfícies foram geradas considerando o substrato e os aspartatos 298 e 297 como quânticos (tratados com o método AM1), e o restante do sistema foi tratado com mecânica molecular. Com base nas superfícies de energia potencial foi proposto um mecanismo por etapas, no qual pode ocorrer a formação de um intermediário (Figura 3.7). Aqui mostramos apenas a SEP (Figura 3.8b). De acordo com os resultados, o fechamento do ciclo pode ocorrer durante a transferência do hidrogênio do aspartato 298 para o substrato (Figura 3.8c), enquanto a transferência do próton do substrato para o Asp297 pode ocorrer após o fechamento do ciclo. Na Figura 3.10, a região de menor energia é representada pela coloração verde, enquanto a região de maior energia é representada pela cor azul. A diferença de energia entre as estruturas de transição na região ET1 e os reagentes (RS) corresponde a 35,0 Kcal/mol, enquanto a diferença de energia entre INT correspondeu a 12,0 Kcal/mol. Deve-se destacar que esses resultados foram comparados com outras propostas de mecanismo através de diferentes SEP geradas. Em seguida, o PMF em 2D foi determinado usando AM1/MM, levando-se em consideração as mesmas coordenadas da SEP

comentada acima, em que a energia livre de ativação para o ET1 e ET2 correspondeu a 46,6 Kcal/mol e 9,6 Kcal/mol respectivamente. Com base nestes resultados pode-se inferir que a formação do INT é a etapa limitante da reação. A barreira de energia obtida com PMF 2D AM1/MM foi corrigida utilizando-se B3LYP(6-31(d))/MM, resultando em uma energia livre de ativação de 37,0 Kcal/mol, valor ainda elevado para o tipo de reação estudada, o que pode ser explicado pelo fato de as correções terem sido realizadas com base em geometrias obtidas com método AM1/MM. Por outro lado, as correções usadas apresentam um valor de energia de ativação significativamente mais baixo do que o obtido através do método AM1/MM.

Mapa do potencial eletrostático (MPE)

O mapa do potencial eletrostático (MPE) pode ser definido como a interação de energia entre distribuição de cargas de uma molécula e uma unidade de carga positiva. Em outras palavras, o potencial eletrostático de um ponto definido pelas coordenadas x , y e z é obtido em termos da energia do potencial eletrostático entre uma carga imaginária (+1) e a molécula em questão. Caso a carga seja atraída pela molécula, o potencial é negativo, se a carga for repelida pela molécula, o potencial é positivo. Os MPEs fornecem informações importantes para a predição de reatividade química, e também podem ser usados para demonstrar similaridades entre pontos estacionários e inibidores.

Entre os inibidores conhecidos de glicosídeo hidrolase estão o PUGNAc (Figura 3.9), NAG-tiazolina e GlcNAcstatin, sendo que este último é o mais potente⁷⁰. No exemplo tratado aqui, usamos as estruturas do RS, ET1, ET2 e PS obtidas através da SEP e do PMF para calcular o MEP. Em seguida comparamos o MEP dos pontos estacionários com o MEP dos inibidores citados acima. Os resultados foram encorajadores, pois a distribuição de carga do inibidor mais potente é semelhante a do TS1 (Figura 3.8), o que está de acordo com dados experimentais e com a ideia de Pauling, comentada no início do capítulo, de que os inibidores AET seriam mais efetivos. Na Figura 3.9 queremos ilustrar a importância da construção da SEP e PMF para determinação dos pontos estacionários (R, ET e P) e, consequentemente, para o entendimento de reações enzimáticas. Além disso, queremos ilustrar a possibilidade de desenhar moléculas semelhantes ao ET. Mais informações sobre o exemplo mostrado aqui podem ser obtidas a partir da referência⁶⁵.

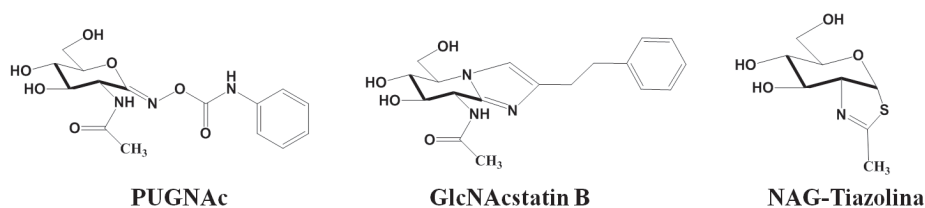


Figura 3.9 Inibidores de glicosídeo hidrolase utilizados neste estudo.

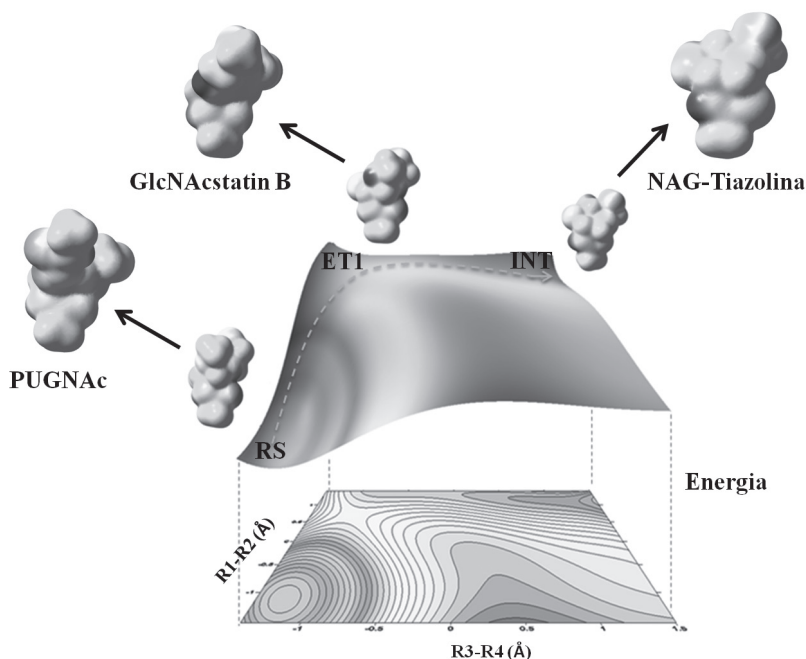


Figura 3.10 PMF-2D do mecanismo enzimático.

3.3.2 Desenho racional de catalisadores biológicos

O estudo de reações químicas e a síntese de moléculas complexas compreendem um campo de estudo e pesquisa ainda a ser explorado, uma vez que a própria natureza possui habilidade de produzir estruturas moleculares complexas envolvidas nos importantes processos da vida como, por exemplo, no reconhecimento molecular e na catálise enzimática. Apesar de a

catálise química ser uma área bastante explorada, a habilidade ilimitada de selecionar ou produzir catalisadores específicos para qualquer transformação química desejada, a partir de qualquer reagente químico, ainda não foi concretizada. Assim, o desenho racional de catalisadores específicos ainda é um árduo problema tanto para os químicos sintéticos como para os bioquímicos. Dessa forma, uma alternativa bem-sucedida para esse problema faz uso da diversidade do sistema imune para produzir uma nova classe de enzimas: os anticorpos catalíticos⁶⁸.

Anticorpos catalíticos são proteínas, pertencentes à classe das globulinas, produzidas pelo sistema imune para reconhecer substâncias estranhas, chamadas de antígenos, e iniciar o processo de neutralização ou destruição de tais agentes estranhos. A habilidade em selecionar um dentre 10^{12} possíveis anticorpos que se ligam virtualmente a qualquer molécula-alvo torna o sistema imune uma fonte atrativa de catalisadores específicos. O princípio básico para a geração de anticorpos catalíticos foi primeiramente proposto por Jencks⁶ e construído no preceito de Pauling³, em que as enzimas seriam moléculas complementares ao complexo ativado da reação na qual atuam como catalizadores, sendo que a atração da enzima pelo complexo ativado levaria a uma diminuição de energia³. Dessa forma, as enzimas podem ser comparadas aos anticorpos, que são estruturas complementares aos antígenos. As enzimas possuem seu poder de catálise especificado a partir de seu processo de evolução, então, ao se produzir um anticorpo catalítico, uma atividade secundária é adquirida pela enzima em questão. Enzimas catalisam reações por estabilizarem preferencialmente estados de transição, proporcionando diminuição da energia livre de ativação ao longo da coordenada de reação. Anticorpos são extremamente eficientes quanto à capacidade de ligação, podendo exceder a de enzimas, mas o fazem ao estado fundamental⁶⁹.

Nesta seção serão apresentados resultados de uma pesquisa desenvolvida por Martí e colaboradores⁷⁰ sobre a proposta de desenho racional de anticorpos catalíticos a partir do uso de métodos híbridos MQ/MM e PMF.

3.3.2.1 Alvo estudado

Como ponto de partida para o estudo de uma reação no meio enzimático, utiliza-se uma estrutura cristalográfica da proteína que contenha uma molécula que seja estável e análoga ao estado de transição (ET); entretanto, essa molécula não corresponde ao substrato real de que a proteína necessita para realizar a catálise. Nesse ponto, dois inconvenientes surgem: em primeiro

lugar, as interações encontradas entre a molécula análoga e os resíduos que compõem o sítio catalítico da proteína não correspondem exatamente às que são encontradas para o ET e, em segundo lugar, as técnicas experimentais de cristalografias não refletem a flexibilidade do sistema. Essas limitações levam apenas a uma parcial compreensão do completo mecanismo molecular da reação química catalisada pela proteína⁷¹⁻⁷³, o qual necessita de técnicas adicionais para sua completa elucidação. Nesse ponto, os métodos de modelagem molecular tornam-se cruciais não só para a elucidação dessa reação, bem como, para a proposição de mudanças estruturais (ou mutações) que favoreçam ou não o caminho reacional.

No estudo realizado por Martí e colaboradores⁷⁰ um protocolo teórico é apresentado com o objetivo de avaliar a eficiência de um anticorpo catalítico, denominado 1F7, que catalisa a corismato a pufenato por um rearranjo (Figura 3.11). As informações obtidas pelos métodos computacionais aplicados permitiram a proposta de mutação de um resíduo que componha o sítio catalítico da proteína, sendo que essa mutação levou a uma diminuição da energia de ativação do sistema em relação ao estado original (não mutado), favorecendo aumento da constante de velocidade da reação em um grau de magnitude (10^3)⁷⁰.

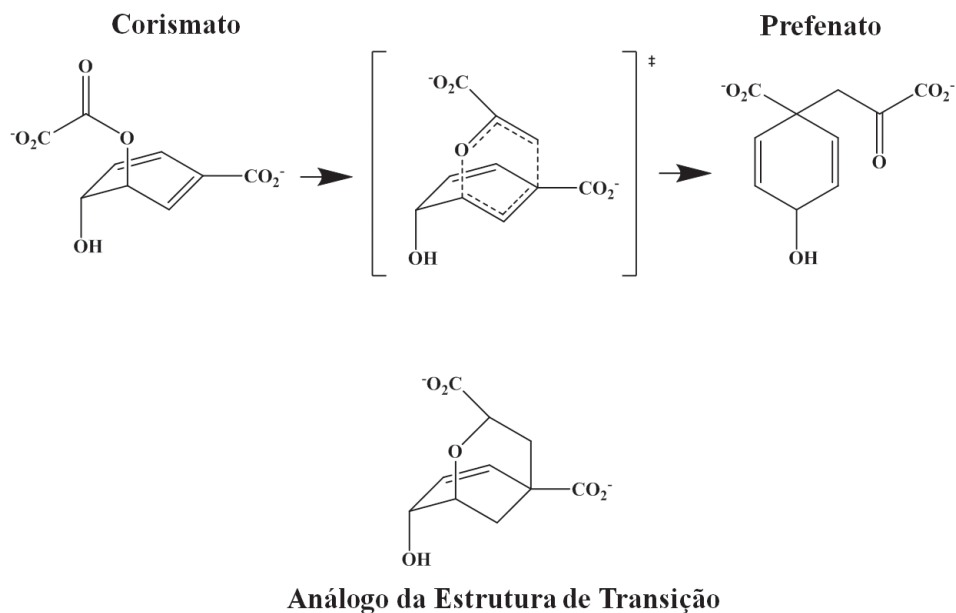


Figura 3.11 Mecanismo molecular do corismato a pufenato por rearranjo.

3.3.2.2 Métodos

Como relatado pelos autores do estudo, a estrutura cristalográfica contendo as coordenadas tridimensionais do sistema de interesse foi obtida do banco de dados de proteína (Protein Data Bank) com o código de acesso 1F7⁷⁴ (Figura 3.12). A mutação no sistema 1F7 foi induzida manualmente, e o resíduo Asn na posição 33 foi mutado para o resíduo Ser (Figura 3.13). Para simular a reação ocorrida no meio aquoso, todos os sistemas (proteína e substrato) foram imersos em uma caixa cúbica composta por moléculas de água. O substrato foi descrito utilizando o método de mecânica quântica AM1¹⁹, enquanto a proteína e as moléculas foram descritas com os métodos de mecânica clássica, formados pelos campos de forças OPLS-AA e TIP3P. As simulações foram realizadas utilizando o pacote computacional fDynamo⁵⁹.

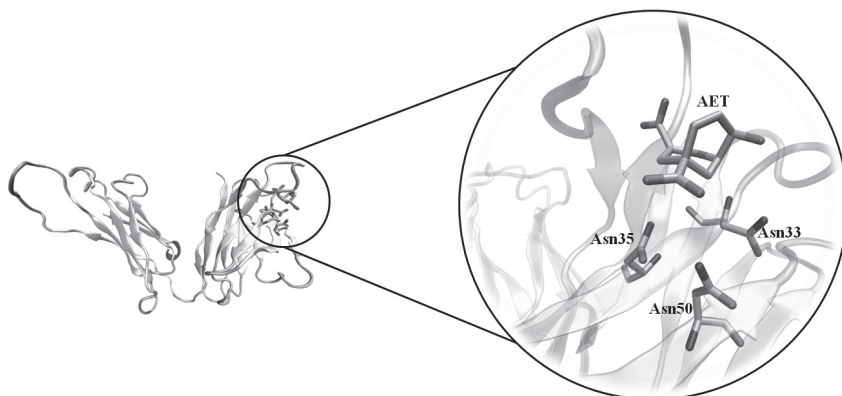


Figura 3.12 Representação da estrutura 3D do 1F7.

Os sistemas foram equilibrados a 300 K usando o *ensemble* canônico* (NVT), em que N (número de átomos), V (volume) e T (temperatura) foram mantidos constantes ao longo do processo. O potencial de força média (PFM) foi obtido a partir da combinação antissimétrica de duas coordenadas de reação previamente determinadas pelos autores. O potencial parabólico

* Um *ensemble* estatístico é um conjunto de vários sistemas que, apesar de suas condições iniciais diferentes, são idênticos a um sistema estatisticamente considerado. Em física estatística, *ensemble* canônico é um *ensemble* estatístico que modeliza um sistema físico em contato com um reservatório térmico de temperatura fixa, supondo que o volume e o número de partículas do sistema também são fixos. O *ensemble* canônico descreve tipicamente um sistema em contato com um reservatório térmico através de uma parede diatérmica, fixa e impermeável, mas sua aplicação transcende os limites da física.

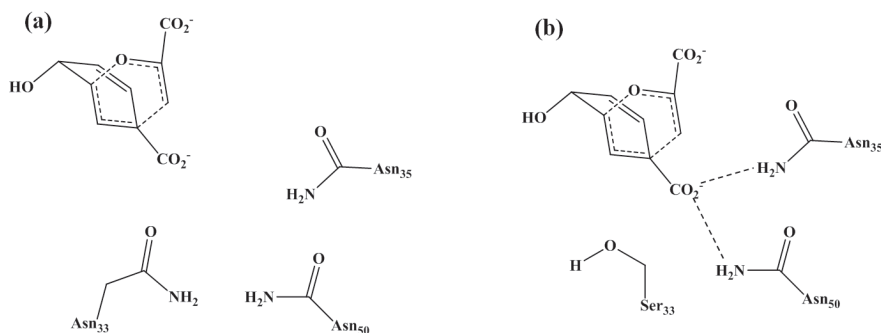


Figura 3.13 Principais interações induzidas pela mutação Asn33Ser.

que restringe as coordenadas de reação ao longo do processo reacional foi mantido com uma constante de 2.500 KJ/mol.Å, durante uma série de 70 simulações. Cada uma dessas simulações consiste de 5 ps de um estágio de equilíbrio e 10 ps de um estágio de produção, sendo que apenas neste último os valores de coordenadas são considerados para o cálculo do PFM. Por fim, o método WHAM³⁶ foi utilizado para obter a função de probabilidade total das coordenadas de reação.

3.3.2.3 Resultados e discussão

A energia envolvida na catálise realizada pelo anticorpo catalítico 1F7 pode ser comparada com a eficiência catalítica das enzimas corismato mutase (CM), que são enzimas-chave na rota biossintética do chiquimato para a produção de aminoácidos aromáticos em bactérias, fungos e plantas^{75,76}. As CM de diferentes organismos, como *Bacillus subtilis* (BsCM)⁷⁷ ou *E. coli* (EcCM)⁷⁸, exibem similares propriedades cinéticas, uma vez que mantêm um grau de similaridade em sua sequência de aminoácidos. O 1F7 possui uma modesta atividade em relação a CM determinada experimentalmente^{79,80}.

Dentre os resíduos importantes para a manutenção da atividade CM do 1F7 destacam-se os resíduos Asn33, Asn35 e Asn50 (Figura 3.11), que fazem parte da região catalítica desse anticorpo e, portanto, interagem diretamente no reconhecimento do substrato utilizado na catálise. Assim, Martí e colaboradores propuseram a mutação do resíduo Asn33 para Ser33, bem como analisaram qual a influência desta para a catálise realizada pelo 1F7.

Dentre os resultados mais relevantes, a mutação induziu uma redução da energia de ativação do processo em relação ao estado não mutado do 1F7. A energia obtida a partir do estado mutado desse anticorpo pode ser comparada de forma mais próxima aos resultados teóricos e experimentais encontrados para as enzimas (*BsCM*)⁷⁷ ou *E. coli* (*EcCM*)⁷⁸ (Tabela 3.1). Sendo assim, a eficiência catalítica do 1F7 foi melhorada quando o resíduo Asn33 foi mutado para Ser33. Ainda de acordo com os pesquisadores, a mutação induzida nesse estudo facilitou a acomodação do substrato no sítio catalítico do 1F7; dessa forma, também contribuiu para o seu reconhecimento e diminuição da energia envolvida no processo.

Tabela 3.1 Valores teóricos e experimentais de energia livre⁷⁰

| | <i>BSCM</i> | <i>ECCM</i> | 1F7 | 1F7 (ASN33SER) |
|-------------------------------------|-------------|-------------|------|----------------|
| $\Delta G_{\text{teo.}}^{\ddagger}$ | 20,6 | 20,9 | 27,5 | 23,0 |
| $\Delta G_{\text{exp.}}^{\ddagger}$ | 15,4 | 17,2 | 21,6 | – |

Com o intuito de validar o método teórico aplicado, os autores do estudo verificaram a eficácia do método aplicado comparando os resultados teóricos e experimentais, como pode ser observado na Tabela 3.1. A princípio foram determinados os valores energéticos experimentais para as duas enzimas com atividade CM^{77,78} e o anticorpo 1F7, também com atividade CM^{79,80}. Os resultados teóricos encontrados estão em concordância com os resultados experimentais previamente determinados. Assim, o efeito da mutação sugerida no estudo em questão inferiu em uma diminuição da energia, portanto, o mesmo comportamento energético deve ser esperado experimentalmente. No entanto, é necessário que as mutações propostas por métodos computacionais sejam realizadas experimentalmente com o intuito de melhorar a atividade do anticorpo catalítico 1F7.

3.4 CONCLUSÕES

A diminuição da energia de ativação envolvida no processo de catálise pode implicar em um aumento na constante de velocidade na ordem de 10^3 , o que representa uma melhora na eficiência catalítica do anticorpo 1F7 com atividade CM. A partir do estudo realizado utilizando métodos computacionais juntamente com estratégias experimentais, abrem-se novas e eficientes

perspectivas para a produção de novos anticorpos catalíticos, bem como de enzimas com uma atividade secundária. Dessa forma, estes podem ser aproveitados nos campos farmacêutico e industrial, nos quais novas bio-transformações podem ser propostas sob um ponto de vista biotecnológico. Além disso, o mesmo procedimento pode ser aplicado para outros sistemas que possuam o mesmo interesse biológico.

3.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em princípio, o entendimento detalhado de um determinado mecanismo enzimático pode contribuir para o desenho de potentes inibidores ou anticorpos catalíticos. Entretanto, até o momento os métodos apresentados aqui ainda não apresentam grande impacto nestas áreas, o que se deve principalmente ao elevado custo computacional que o emprego desses métodos ainda exige. No entanto, com o desenvolvimento de supercomputadores, esses métodos podem se tornar cada vez mais rotineiros para tais propósitos.

Deve-se enfatizar também que o desenho computacional de enzimas com base na ET ainda é um desafio muito grande, pois a sequência primária de uma determinada proteína pode assumir na prática inúmeras conformações. Por outro lado, muitos avanços já foram alcançados na área, entre os quais se pode destacar o desenho com êxito de sítios ativos enzimáticos para reações de Diels-Alder⁸¹ e de eliminação de Kemp⁸². Em princípio, pode-se usar o protocolo descrito pelos autores do Rosetta⁸³ para desenho *de novo* de enzimas para qualquer reação química de interesse. Este protocolo consiste nas seguintes etapas: (1) escolher o mecanismo catalítico e determinação de um modelo de reação para o sítio ativo; (2) identificar regiões entre um conjunto de proteínas nas quais esta reação pode ser realizada; (3) determinar e otimizar resíduos vizinhos capazes de estabilizar o ET e os resíduos catalíticos; e (4) avaliar e classificar as sequências analisadas. Após a determinação por técnicas computacionais, as enzimas desenhadas podem ser produzidas e testadas experimentalmente.

Dessa forma, o desenho racional de sistemas biológicos estáveis, como as enzimas, os inibidores e os anticorpos, com novas atividades catalíticas, é de grande interesse prático e possui potenciais aplicações em biotecnologia, biomedicina e processos industriais, e não somente vistos de uma perspectiva teórica. Finalmente, na Tabela 3.2 são mostradas algumas aplicações de métodos de simulação computacional em sistemas de interesses biológicos.

Tabela 3.2 Aplicações computacionais de sistemas biológicos

| BIOMOLÉCULA | PROCESSO ESTUDADO | NÍVEL MQ | NÍVEL MM | REF. |
|---------------------------------------|--------------------------------------|------------|-----------------|------|
| Várias | Mecanismo catalítico | AM1 DFT | CHARMM AMBER | 84 |
| Acetilcolinesterase | Mecanismo de inibição | DFT | AMBER | 85 |
| Protease de HIV-1 | Interação de inibidores | AM1 DFT | OPLS | 86 |
| Lipase | Estudo de mutações | AM1 | UFF | 87 |
| Dihidroorotato | Mecanismo catalítico | AM1 DFT | OPLS | 67 |
| D-Glucarato Desidratase | Reconhecimento de substrato | DFT | AMBER | 88 |
| Alcalino Fosfatase | Estabilização do estado de transição | AM1 | CHARMM | 89 |
| Amido Hidrolase | Mecanismo de inibição | DFTB | CHARMM | 90 |
| Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase | Mecanismo catalítico | AM1 DFT | OPLSA | 66 |
| Butirilcolinesterase | Estudo de mutações | DFT | AMBER | 91 |

REFERÊNCIAS

1. Warshel A. Computer simulations of enzyme catalysis: Methods, progress, and insights. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2003;32: 425-43.
2. Ferrer S, et al. Hybrid schemes based on quantum mechanics/molecular mechanics simulations: goals to success, problems, and perspectives. In: Christov C, editor. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Vol. 85: Computational Chemistry Methods in Structural Biology. Oxford: Academic Press; 2011. p. 81-142.
3. Pauling L. Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature*. 1948;161(4097):707-9.
4. Schramm VL. Transition States, Analogues, and Drug Development. *Acs Chemical Biology*, 2013;8(1):71-81.
5. Golynskiy MV, Seelig B. De novo enzymes: from computational design to mRNA display. *Trends in Biotechnology*. 2010;28(7):340-5.
6. Jencks WP. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. New York: M. Hill; 1969.
7. Warshel A, Levitt M. Theoretical studies of enzymic reactions – dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium-ion in reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*. 1976;103(2):227-49.
8. Senn HM, Thiel W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2009;48(7):1198-1229.
9. Field MJ, Bash PA, Karplus M. A combined quantum-mechanical and molecular mechanical potential for molecular-dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 1990;11(6):700-33.
10. Shurki A, Warshel A. Structure/function correlations of proteins using MM, QM/MM, and related approaches: Methods, concepts, pitfalls, and current progress. In: Daggett V, editor. *Protein Simulations*. Oxford: Academic Press; 2003. p. 249-313.
11. Gao JL. Hybrid quantum and molecular mechanical simulations: An alternative avenue to solvent effects in organic chemistry. *Accounts of Chemical Research*. 1996;29(6):298-305.
12. Bakowies D, Thiel W. Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. *Journal of Physical Chemistry*. 1996;100(25):10580-94.
13. Arantes GM. Free-energy profiles for catalysis by dual-specificity phosphatases. *Biochemical Journal*. 2006;399:343-50.
14. Friesner RA, Beachy MD. Quantum mechanical calculations on biological systems. *Current Opinion in Structural Biology*. 1998;8(2):257-62.
15. Marti S, et al. Transition structure selectivity in enzyme catalysis: a QM/MM study of chorismate mutase. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2001;105(3):207-12.
16. Field MJ. Simulating enzyme reactions: Challenges and perspectives. *Journal of Computational Chemistry*. 2002;23(1):48-58.

17. Lyne PD, Mulholland AJ, Richards WG. Insights into chorismate mutase catalysis from a combined QM/MM simulation of the enzyme reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117(45):11345-50.
18. Ruiz-Pernia JJ, et al. A QM/MM study of the reaction mechanism for the 3'-processing step catalyzed by HIV-1 integrase. *Journal of Molecular Structure-Theochem*. 2009;898(1-3):115-120.
19. Dewar MJS, et al. The developments and use of quantum-mechanical molecular-models .76. AM1 – A new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. *Journal of the American Chemical Society*. 1985;107(13):3902-9.
20. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods .1. method. *Journal of Computational Chemistry*. 1989;10(2):209-20.
21. Cornell WD, et al. A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids, and organic-molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117(19):5179-97.
22. Wang JM, Cieplak P, Kollman PA. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry*. 2000;21(12):1049-74.
23. MacKerell AD, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*. 1998;102(18):3586-3616.
24. Foloppe N, MacKerell AD. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *Journal of Computational Chemistry*. 2000;21(2):86-104.
25. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 1996;118(45):11225-36.
26. Born M, Oppenheimer R. Quantum theory of molecules. *Annalen Der Physik*. 1927;84(20):0457-84.
27. Brooks CL, Karplus M. Deformable stochastic boundaries in molecular-dynamics. *Journal of Chemical Physics*. 1983;79(12):6312-25.
28. Thery V, et al. Quantum-mechanical computations on very large molecular-systems – The local self-consistent-field method. *Journal of Computational Chemistry*. 1994;15(3):269-82.
29. Singh UC, Kollman PA. A combined abinitio quantum-mechanical and molecular mechanical method for carrying out simulations on complex molecular-systems – Applications to the CH₃CL + CL- exchange-reaction and gas-phase protonation of polyethers. *Journal of Computational Chemistry*. 1986;7(6):718-30.
30. Carlson HA, Jorgensen WL. Monte Carlo investigations of solvent effects on the chorismate to prephenate rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*. 1996;118(35):8475-84.

31. Bornemann S, Lowe DJ, Thorneley RNF. The transient kinetics of *Escherichia coli* chorismate synthase: Substrate, consumption, product formation, phosphate dissociation, and characterization of a flavin intermediate. *Biochemistry*. 1996;35(30):9907-16.
32. Marti S, et al. A hybrid potential reaction path and free energy study of the chorismate mutase reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123(8):1709-12.
33. Hu H, et al. Quantum mechanics/molecular mechanics minimum free-energy path for accurate reaction energetics in solution and enzymes: Sequential sampling and optimization on the potential of mean force surface. *Journal of Chemical Physics*. 2008;128(3).
34. Alder BJ, Wainwright TE. Phase transition for a hard sphere system. *Journal of Chemical Physics*. 1957;27(5):1208-9.
35. Alder BJ, Wainwright TE. Studies in molecular dynamics .1. general method. *Journal of Chemical Physics*. 1959;31(2):459-466.
36. Roux B. The calculation of the potential of mean force using computer-simulations. *Computer Physics Communications*. 1995;91(1-3):275-82.
37. Verlet L. Computer experiments on classical fluids .I. thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical Review*. 1967;159(1):98-8.
38. Metropolis N, et al. Equation of state calculation by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics*. 1953;21(6):1087-92.
39. Barlette VE, Freitas LCG. Statistical thermodynamics of liquids using the Monte Carlo method. I. Methodology. *Química Nova*. 1999;22(2):254-62.
40. Kumar S, et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules .1. the method. *Journal of Computational Chemistry*. 1992;13(8):1011-21.
41. MacBeath G, Kast P, Hilvert D. A small, thermostable, and monofunctional chorismate mutase from the archeon *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry*. 1998;37(28):10062-73.
42. Zwanzig RW. High-temperature equation of state by a perturbation method .1. nonpolar gases. *Journal of Chemical Physics*. 1954;22(8):1420-6.
43. Eyring H. The activated complex in chemical reactions. *Journal of Chemical Physics*. 1935;3(2):107-15.
44. Laidler KJ, King MC. The development of transition-state theory. *Journal of Physical Chemistry*. 1983;87(15):2657-64.
45. Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*. 1996;316:695-6.
46. Dong DLY, Hart GW. Purification and characterization of an O-GLCNAC selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(30):19321-30.
47. Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: Signal transduction and O-GlcNAc. *Science*. 2001;291(5512):2376-8.

48. Macauley MS, et al. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis – Kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(27):25313-22.
49. Whitworth GE, et al. Analysis of PUGNAc and NAG-thiazoline as transition state analogues for human O-GlcNAcase: Mechanistic and structural insights into inhibitor selectivity and transition state poise. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(3):635-44.
50. Akimoto Y, et al. O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins and diabetes. *Medical Molecular Morphology*. 2005;38(2):84-91.
51. Vosseller K, et al. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(8):5313-8.
52. Shafi R, et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(11):5735-9.
53. Arnold CS, et al. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(46):28741-4.
54. Butters TD, Dwek RA, Platt FM. New therapeutics for the treatment of glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2003;535:219-26.
55. Mendel DB, et al. Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuramidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(3):640-6.
56. Rao FV, et al. Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. *Embo Journal*. 2006;25(7):1569-78.
57. Li H, Robertson AD, Jensen JH. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK(a) values. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*. 2005;61(4):704-21.
58. Torrie GM, Valleau JP. Non-physical sampling distributions in Monte-Carlo free-energy estimation. Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*. 1977;23(2):187-99.
59. Field MJ, et al. The Dynamo library for molecular simulations using hybrid quantum mechanical and molecular mechanical potentials. *Journal of Computational Chemistry*. 2000;21(12):1088-100.
60. Plotnikov NV, Warshel A. Exploring, Refining, and Validating the Paradynamics QM/MM Sampling. *Journal of Physical Chemistry B*. 2012;116(34):10342-56.
61. Warshel A, Weiss RM. An empirical valence bond approach for comparing reactions in solutions and in enzymes. *Journal of the American Chemical Society*. 1980;102(20):6218-26.

62. Nguyen KA, Rossi I, Truhlar DG. A dual-level shepard interpolation method for generating potential-energy surfaces for dynamics calculations. *Journal of Chemical Physics*. 1995;103(13):5522-30.
63. Ruiz-Pernia JJ, et al. Hybrid QM/MM potentials of mean force with interpolated corrections. *Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108(24):8427-33.
64. Heightman TD, Vasella AT. Recent insights into inhibition, structure, and mechanism of configuration-retaining glycosidases. *Angewandte Chemie-International Edition*. 1999;38(6):750-70.
65. Lameira J et al. Enzyme Molecular Mechanism as a Starting Point to Design New Inhibitors: A Theoretical Study of O-GlcNAcase. *Journal of Physical Chemistry B*. 2011;115(20):6764-75.
66. Reis M, et al. The catalytic mechanism of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* elucidated via the QM/MM approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013;15(11):3772-85.
67. Silva NDF, et al. Computational study of the mechanism of half-reactions in class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013;15(43):18863-71.
68. Justo GZ. Catalytic antibodies: Expanding the scope of enzymatic catalysis. *Química Nova*. 1998;21(1):86-98.
69. Tramontano A, Janda KD, Lerner RA. Catalytic antibodies. *Science*. 1986;234(4783):1566-70.
70. Marti S, et al. Computer-aided rational design of catalytic antibodies: The 1F7 case. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2007;46(1-2):286-90.
71. Gustafsson C, Govindarajan S, Emig R. Exploration of sequence space for protein engineering. *Journal of Molecular Recognition*. 2001;14(5):308-14.
72. Morley KL, Kazlauskas RJ. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology*. 2005;23(5):231-7.
73. Penning TM, Jez JM. Enzyme redesign. *Chemical Reviews*. 2001;101(10):3027-46.
74. Haynes MR, et al. Routes to catalysis – Structure of a catalytic antibody and comparison with its natural counterpart. *Science*. 1994;263(5147):646-52.
75. Haslam E. *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*, New York: Wiley; 1993.
76. Weiss U, Edwards JM. *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. New York: Wiley; 1980.
77. Chook YM, Ke HM, Lipscomb WN. Crystal-structures of the monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis* and its complex with a transition-state analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(18):8600-3.
78. Lee AY, et al. Atomic-structure of the buried catalytic pocket of *Escherichia coli* chorismate mutase. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117(12):3627-8.

79. Hilvert D, et al. Catalysis of concerted reactions by antibodies – The Claisen rearrangement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(14):4953-5.
80. Hilvert D, Nared KD. Stereospecific Claisen Rearrangement Catalyzed by an antibody. *Journal of the American Chemical Society*. 1988;110(16):5593-4.
81. Siegel JB, et al. Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction. *Science*. 2010;329(5989):309-13.
82. Rothlisberger D, et al. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*. 2008;453(7192):190-95.
83. Richter F, et al. De Novo Enzyme Design Using Rosetta3. *Plos One*. 2011;6(5).
84. Van der Kamp MW, Mulholland AJ. Combined Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) Methods in Computational Enzymology. *Biochemistry*. 2013;52(16):2708-28.
85. Sirin GS, et al. Aging Mechanism of Soman Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Physical Chemistry B*. 2012;116(40):12199-207.
86. Swiderek K, Marti S, Moliner V. Theoretical studies of HIV-1 reverse transcriptase inhibition. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012;14(36):12614-24.
87. Ni Z, et al. Just an additional hydrogen bond can dramatically reduce the catalytic activity of *Bacillus subtilis* lipase A I12T mutant: An integration of computational modeling and experimental analysis. *Computers in Biology and Medicine*. 2013;43(11):1882-8.
88. Tian B, et al. Predicting Enzyme-Substrate Specificity with QM/MM Methods: A Case Study of the Stereospecificity of D-Glucarate Dehydratase. *Biochemistry*. 2013;52(33):5511-3.
89. Hou G, Cui Q. Stabilization of Different Types of Transition States in a Single Enzyme Active Site: QM/MM Analysis of Enzymes in the Alkaline Phosphatase Superfamily. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(28):10457-69.
90. Lodola A, et al. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Modeling of Fatty Acid Amide Hydrolase Reactivation Distinguishes Substrate from Irreversible Covalent Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;56(6):2500-12.
91. Yao Y, Liu J, Zhan C-G. Why Does the G117H Mutation Considerably Improve the Activity of Human Butyrylcholinesterase against Sarin? Insights from Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Free Energy Calculations. *Biochemistry*. 2012;51(44):8980-92.

4

CAPÍTULO

PROCESSOS DE BIOCONVERSÃO APLICADOS À OBTENÇÃO DE FÁRMACOS E INTERMEDIÁRIOS

Maria Antonieta Ferrara
Antonio Carlos Siani
Elba Pinto da Silva Bon

4.1 INTRODUÇÃO

No curso da história da civilização, o homem descobriu que os micro-organismos poderiam ser seus aliados na transformação e adaptação de substratos orgânicos às suas necessidades cotidianas. Assim, mesmo antes de ter qualquer noção da existência deles, o homem já os usava para a produção de alimento e bebidas. Pode-se afirmar o mesmo para as enzimas, que, paralelamente, tiveram aplicações similares com base empírica, como bem exemplifica o uso do suco gástrico de bezerros na manufatura de queijos, um procedimento cuja origem é indeterminada no tempo. Esse processo de modificar certos compostos por reações simples e bem definidas quimicamente, catalisadas por micro-organismos ou por enzimas isoladas é, nos dias de hoje, denominado “biotransformação” ou “bioconversão”¹.

Assim, a bioconversão subentende os processos que utilizam enzimas isoladas, micro-organismos ou células de plantas para converter uma molécula precursora, em geral um xenobiótico, em um produto de alto valor agregado. A diferença essencial entre fermentação e biotransformação é que a fermentação ocorre a partir de fontes de nutrientes e de energia e envolve inúmeras etapas catalíticas entre o substrato e o produto gerado, enquanto há apenas um ou poucos passos reacionais em uma biotransformação. Adicionalmente, as estruturas químicas do substrato e do produto são similares ou aparentadas, o que não necessariamente ocorre na fermentação. Neste processo, a molécula que sofrerá a transformação é adicionada ao sistema biológico já constituído, e o produto normalmente envolve uma substância com valor agregado que justifique a utilização da conversão biológica (Figura 4.1)¹.

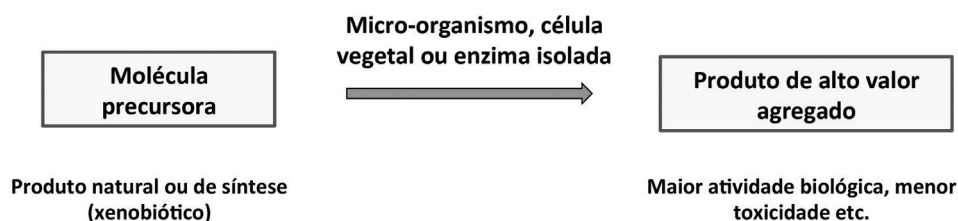


Figura 4.1 Representação esquemática do processo de bioconversão.

As enzimas são biocatalisadores eficientes, cujo potencial de suporte a processos tecnológicos é evidenciado pela diversidade existente dessas moléculas e, por extensão, pela variedade e complexidade de reações químicas que podem ser catalisadas enzimaticamente. Nesse contexto, a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) reconhece mais de 5.858 diferentes enzimas (dados de novembro de 2016), que estão catalogadas em seu site*. Essa *homepage* é um repositório de informações e descreve cada tipo de enzima caracterizada, com a sua identificação segundo a Enzyme Commission (EC). A Tabela 4.1 apresenta as seis classes de enzimas e o tipo de reação catalisada. Cada classe é dividida em mais três subclasses

* Ver www.expasy.ch/enzyme.

progressivas, que classificam as enzimas de forma mais específica. A Figura 4.2 exemplifica essa divisão para a classe das oxidorreduases.

Em contrapartida aos catalisadores químicos tradicionais, as enzimas apresentam elevada especificidade nas alterações que promovem nos substratos. Assim, os processos de bioconversão normalmente geram produtos com químio, régio e enantiosseletividade, minimizando ou mesmo eliminando a formação de subprodutos, com ganhos de rendimento no produto de interesse e, por conseguinte, com considerável diminuição de custos com as etapas de separação e purificação. Essa vantagem inclui a utilização de condições reacionais brandas e o envolvimento de menos etapas reacionais. Também evita a necessidade de proteger grupos químicos lábeis e exime o emprego de solventes orgânicos para a reação, resultando em menor consumo de energia, menor impacto ambiental dos efluentes gerados nos processos enzimáticos (ressaltando-se a inerente biodegradabilidade das próprias enzimas) e não acumulação de resíduos no meio ambiente (ao contrário do que ocorre com os catalisadores químicos, muitas vezes poluentes e de difícil degradação). Além disso, as enzimas e os micro-organismos oferecem a opção de serem imobilizados para reuso em ciclos, possibilitando conduzir processos contínuos de biotransformação¹⁻⁵.

Tabela 4.1 Classes das enzimas e tipo de reação catalisada

| EC | NOME | TIPO DE REAÇÃO CATALISADA |
|----|----------------|---|
| 1 | Oxidorreduases | Oxidação/redução, Oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, C=O ou adição/abstração de prótons |
| 2 | Transferases | Transferências de grupos funcionais: aldeído-, cetona-, acil-, glicosil-, grupos contendo fósforo, entre outras |
| 3 | Hidrolases | Hidrólise/formação de ésteres, amidas, epóxidos, nitrilas, anidridos |
| 4 | Liasas | Adição/eliminação de pequenas moléculas em ligações C=C, C=N, C=O |
| 5 | Isomerases | Isomerizações (racemização, epimerização) |
| 6 | Ligases | Formação/quebra de ligações C-O, C-S, C-N, C-C com consumo de ATP |

Da perspectiva tecnológica, a vantagem mais explícita da bioconversão é sua capacidade inerente de realizar transformações químicas que seriam inviáveis ou economicamente desvantajosas pela via da síntese orgânica. Em seguida, porém não menos importante, está a enantiosseletividade dos processos biocatalisados^{1,6,7}. Dada sua relevância, essa característica tem impulsionado sobremaneira o emprego da tecnologia biocatalítica em processos

| | |
|--|---|
| 1.-.-.- Oxidoredutases | |
| 1.1.-.- Atua em grupo de doadores CH-OH | 1.1.1.- com NAD(+) ou NADP(+) como aceptor |
| 1.2.-.- Atua em grupo de doadores aldeído ou oxo | 1.1.2.- com citocromo como aceptor |
| 1.3.-.- Atua em grupo de doadores CH-CH | 1.1.3.- com oxigênio como aceptor |
| 1.4.-.- Atua em grupo de doadores CH-NH ₂ | 1.1.4.- com dissulfeto como aceptor |
| 1.5.-.- Atua em grupo de doadores CH-NH | 1.1.5.- com quinona ou compostos semelhantes como aceptor |
| 1.6.-.- Atua em NADH ou NADPH | 1.1.9.- com proteína com cobre como aceptor |
| 1.7.-.- Atua em outros compostos nitrogenados como doadores | 1.1.98.- com outros aceptores conhecidos |
| 1.8.-.- Atua em grupos sulfurados como doadores | 1.1.99.- com outros aceptores |
| 1.9.-.- Atua em grupos heme como doadores | |
| 1.10.-.- Atua em difenóis e substâncias correlatas como doadores | 1.1.1.1 alcooldesidrogenase |
| 1.11.-.- Atua em peróxido como aceptor | 1.1.1.2 alcooldesidrogenase (NADP(+)) |
| | 1.1.1.3 homoserinadesidrogenase |
| 1.22.-.- Atua em halogênios | 1.1.1.4 (R,R)-butanodioldesidrogenase |
| 1.23.-.- Reduz grupos C-O-C como aceptores | 1.1.1.5 transferido para EC 1.1.1.303 e EC 1.1.1.304 |
| 1.97.-.- Outras oxidoredutases | 1.1.1.6 gliceroldesidrogenase |
| | 1.1.1.7 propanodiol-fosfatodesidrogenase |
| | |
| | 1.1.1.365 D-galacturonato redutase |
| | 1.1.1.366 L-idonato 5-desidrogenase (NAD ⁺) |

Figura 4.2 Diversidade das enzimas, exemplificada pelas subclasses das oxidoredutases.

desenvolvidos para vários setores industriais, em especial o de fármacos⁸⁻¹⁰. Um exemplo desse fato é um levantamento realizado em 2006 que evidencia os fármacos e intermediários de drogas como os produtos mais importantes obtidos por biotransformação, já à época representando mais de 50% dos processos implantados industrialmente¹¹. Entre os princípios ativos constituídos de moléculas pequenas, aprovados para uso pela agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) em 2006, 80% eram compostos quirais e 75% eram enantiômeros puros⁸.

A produção seletiva de um único enantiômero é uma característica buscada para inúmeras moléculas de fármacos, que pode ser viabilizada pelo uso de biocatalisadores. Nesse contexto, além de permitir a redução das etapas (em comparação com a síntese química), a economia em precursores caros e a redução dos custos com purificação são fatores altamente atrativos nos processos que dão suporte à produção em larga escala, principalmente na indústria de fármacos. A razão para tal é que, comumente, os enantiômeros de uma substância bioativa apresentam efeitos farmacológicos e tóxicos diferentes, podendo ser ambos benéficos (atividade sobre o alvo terapêutico) ou um deles benéfico e o outro indesejado (tóxico, inibidor ou inativo).

Um exemplo emblemático é a talidomida, cuja forma dextrógira (enantiômero R) apresenta efeito sedativo, enquanto a forma levógira (enantiômero S) é teratogênica. A propriedade desta segunda forma levou à retirada do mercado da talidomida racêmica, após se descobrir seu efeito causador da deformidade em fetos. Entre seu lançamento em 1957, indicada para controlar enjoos, e a proscrição do mercado em 1962, seus efeitos nefastos provocaram uma mudança de paradigma no desenvolvimento de drogas. A partir daí, a regulamentação da indústria farmacêutica aumentou o grau de exigência em relação aos princípios ativos, de forma a garantir que o produto final contenha apenas o enantiômero eficaz de um medicamento. Das dez principais drogas existentes no mercado em 2004, seis eram constituídas de enantiômeros puros, duas de misturas racêmicas, duas de compostos não quirais e uma de proteína recombinante⁸. A Figura 4.3 ilustra a importância da utilização do enantiômero correto em moléculas bioativas.

Uma vez que produzem a mistura racêmica, os processos sintéticos tradicionais normalmente lançam mão de duas estratégias para obter apenas um dos enantiômeros. Uma delas inclui iniciar o processo com materiais já opticamente puros, utilizando processos que não afetem a quiralidade do material de partida. A outra envolve a aplicação de técnicas de síntese assimétrica que favoreçam o curso das reações para a obtenção do enantiômero desejado. Todavia, tanto a síntese de misturas racêmicas ou mesmo os processos com determinados graus de estereoespecificidade exigem a posterior aplicação de algum método de resolução quiral para separar os enantiômeros. Esta tarefa é dificultada devido às propriedades físicas e químicas de ambos os enantiômeros serem virtualmente idênticas (à exceção do comportamento frente à luz polarizada). Ambas essas abordagens para produzir apenas um dos enantiômeros embutem uma relação de custo-benefício econômico bastante desfavorável. Além disso, essa questão é uma condição existente para todos os fármacos que possuem centros quirais.

O uso de processos de biotransformação é atualmente considerado uma vantagem que impacta diretamente a competitividade industrial devido aos seus benefícios econômicos, já que incluem menores custos de processo, maior qualidade do produto final e obtenção de produtos inteiramente novos, em comparação aos processos sintéticos. Adicionalmente, os processos com base em biotransformação têm sido considerados pela sua contribuição na implementação dos chamados processos verdes, que se destacam por resultarem em ganhos evidentes, como menor consumo de energia e preservação ambiental^{1,9,10}.

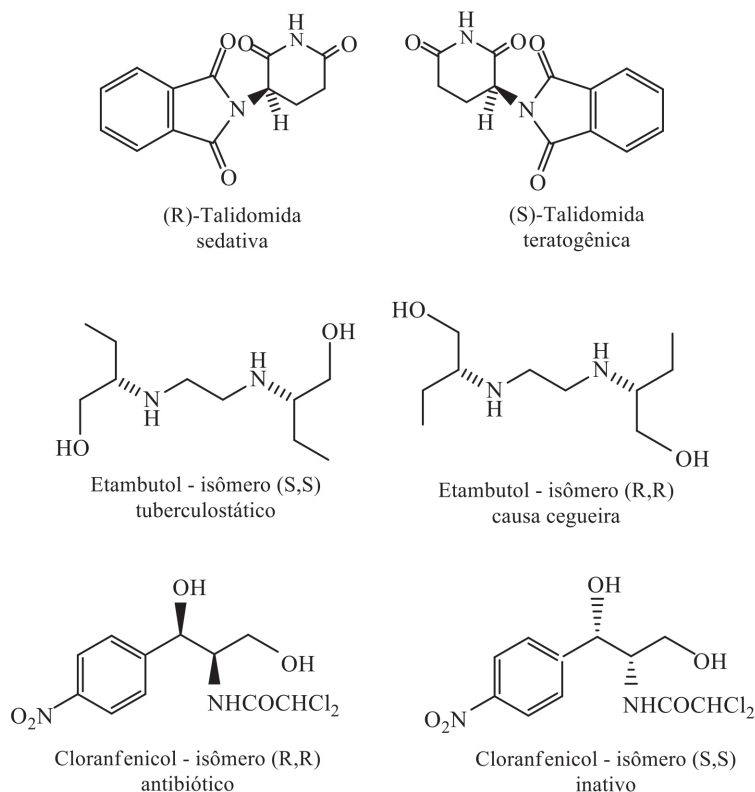


Figura 4.3 Exemplos da importância da abordagem quiral em fármacos.

Por esse motivo, os processos de bioconversão vêm rapidamente adquirindo relevância dentro da academia científica e no setor industrial, já que a pauta atual do desenvolvimento sustentável pressupõe o aumento paulatino do emprego de matérias-primas renováveis e de processos com tecnologias limpas. Assim, o desenvolvimento tecnológico com base na bioconversão vem ganhando espaço em setores produtivos diversos, como o de alimentos, produtos para a agroindústria, cosméticos e, em especial, fármacos e medicamentos^{11,12}.

4.2 HISTÓRICO

Desde remota antiguidade, os micro-organismos têm tido uma enorme importância social e econômica na vida do ser humano, como atestam alguns

registros arqueológicos e históricos. Em cerca de 6000 a.C., os sumérios e babilônios já preparavam a cerveja e os egípcios já utilizavam leveduras para fazer pão, além da preparação do vinho já estar mencionada no Pentateuco (Gênesis). Uma prática que remonta a 2000 a.C., e através dos tempos estabeleceu-se como o paradigma mais patente da transformação realizada com a mediação de células vivas, é a preparação do vinagre. Esse remoto exemplo de oxidação microbiana serve ainda hoje para ilustrar importantes desenvolvimentos que ocorreram no campo da bioconversão, haja vista que o produto dessa transformação, quando obtido por bactérias que processam o etanol para ácido acético, ainda hoje é chamada de vinagre (Figura 4.4).

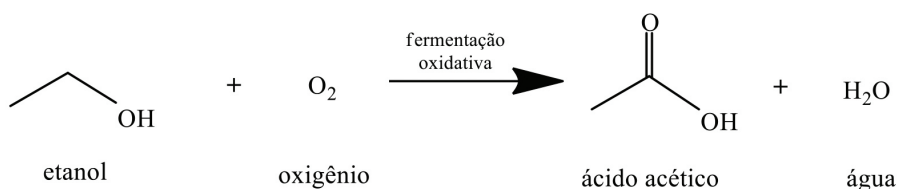


Figura 4.4 Bioconversão de etanol em ácido acético (preparação do vinagre).

As primeiras comunicações sobre a bioquímica dos processos fermentativos envolvendo álcoois e ácidos orgânicos surgiram na segunda metade do século XIX. Vale ressaltar, todavia, que estas só ocorreram depois que R. Hooke, no final do século XVII, ao utilizar o microscópio recém-desenvolvido pelo holandês A. Von Leeuwenhoek, demonstrou serem os seres vivos compostos de pequenas unidades básicas, então denominadas células. Esse foi um marco na biologia experimental, e pode ser também considerado como o ponto de partida no desenvolvimento da bioconversão, já que deu suporte à descoberta das leveduras por L. Pasteur¹³. É interessante o fato de a pesquisa sobre fermentações, à época, estar relacionada a uma preocupação com as moléculas opticamente ativas. Em 1858, Pasteur divulgou o sucesso obtido na resolução ótica do ácido tartárico por via microbiana, ao realizar a fermentação do sal de amônio do ácido racêmico mediada por *Penicilium glaucum*¹⁴. Nesse processo, o fungo metabolizava e degradava apenas o ácido levógiro (+)-tartárico, deixando intacto o ácido dextrógiro (-)-tartárico, que então era purificado por cristalização. Em 1862, Pasteur também investigou a conversão do álcool em vinagre e propôs que

o mecanismo de transporte de oxigênio do ar para o substrato em solução ocorria através de uma película que se formava durante o processo¹⁵. Isso foi confirmado anos mais tarde, em 1886, pelo químico A. J. Brown, que denominou o agente contido nessa película de *Bacterium xylinum*, demonstrando

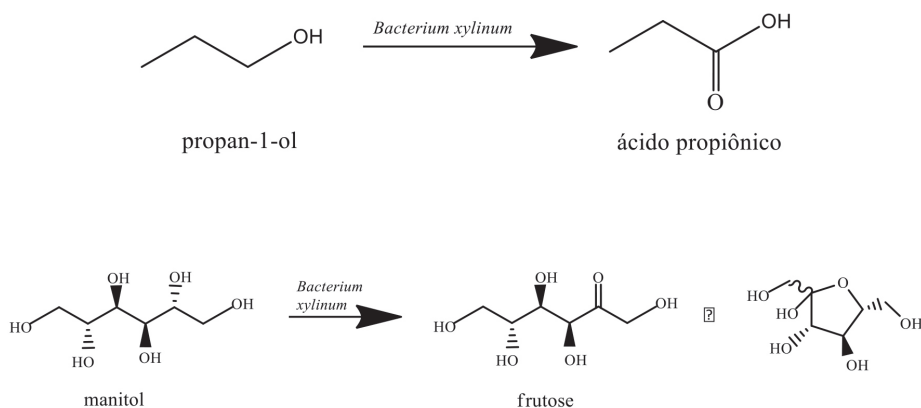


Figura 4.5 Bioconversões do propano-1-ol em ácido propiônico e de manitol em frutose (figura elaborada com base em Vasic-Racki, 2006¹³ e Sebek, 1982¹⁶).

também a capacidade deste de transformar propanol para ácido propiônico e manitol para frutose (Figura 4.5)¹⁶.

Naquela época, investigações paralelas sobre o uso de enzimas também prosseguiram de maneira promissora. As enzimas também possuíam um histórico de milhares de anos de utilização pelo homem, antes de serem inteiramente compreendidas em sua natureza. O exemplo mais emblemático é o emprego do suco gástrico de bezerros na manufatura de queijos, um procedimento cuja origem, como já dissemos, é indeterminada no tempo. Em 1783, L. Spallanzani demonstrou que o suco gástrico digeriu carne, devido à presença do que T. Schawn, em 1836, chamou de pepsina¹⁷. Três anos antes, o francês A. Payen isolou um complexo enzimático do malte que era capaz de digerir o amido, produzindo glicose, o qual chamou de “diastase”¹³.

Em 1897, E. Buchner conseguiu fermentar a glicose para etanol e gás carbônico com levedura inativada, ao esmagar as células pela fricção com areia¹⁸. Essa descoberta convergiu com as pesquisas, já na época, realizadas com enzimas, e resultou numa diferenciação entre o que se passou a chamar de “fermentos organizados”, produzidos por extratos de células fermentativas (como o caso de Buchner); e “fermentos não organizados”, como as

secreções celulares do tipo suco gástrico. Hoje, esses termos representam, respectivamente, as enzimas “intracelulares” e “extracelulares”. O experimento pioneiro de Buchner evidenciou que o potencial de promover transformações químicas estaria ligado, em última instância, ao conteúdo celular – excretado ou não – dos organismos vivos. O termo “enzima” já havia sido proposto por W. F. Kühne em um artigo de 1876 sobre a tripsina pancreática, para denominar então os fermentos “não organizados”¹³.

Dentro de seu monumental legado sobre a química dos açúcares, H. M. Fisher observou, em 1894, que a enzima conhecida como emulsina catalisava a hidrólise do β -metil-(D)-glicosídeo, enquanto a enzima conhecida como maltase era ativa sobre o α -metil-(D)-glicosídeo^{19,20} (Figura 4.6). Esse

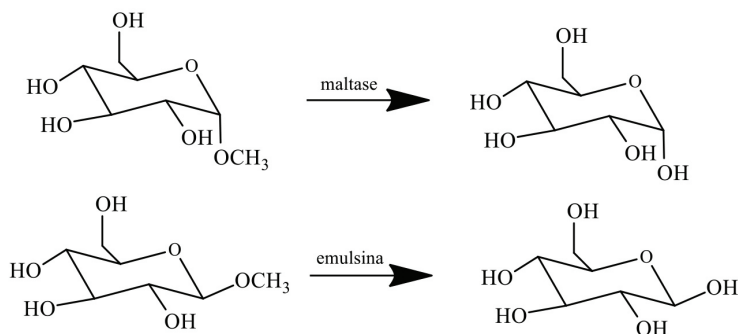


Figura 4.6 Experimentos de Fisher que embasaram a teoria “fechadura e chave” para a ação enzimática (figura elaborada com base em Vasic-Racki, 2006¹³).

evento levou-o a sugerir a famosa teoria da “fechadura e chave” para definir a especificidade enzimática.

O estudo da cinética da catálise enzimática teve um marco importante com a equação desenvolvida em 1913 por L. Michaelis M. L. Menten, que trabalharam com a ação de enzimas purificadas sobre substratos simples (sacarose). A velocidade da reação de conversão enzimática seria dependente da formação de um intermediário na forma de complexo enzima-substrato²¹. Posteriormente, a equação foi generalizada por outros pesquisadores²².

A década de 1920 marcou uma nova etapa no estudo da cinética enzimática, iniciada com os estudos da tripsina purificada, por J. A. V. Butler^{13,23}; assim como a cristalização da primeira enzima de origem vegetal, a urease, extraída da *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) por J. B. Sumner²⁴, o qual

também primeiro enunciou as enzimas como sendo proteínas. No final da década de 1940, muitas enzimas estavam disponíveis na forma purificada por cristalização. A primeira enzima a ser sintetizada em laboratório foi a ribonuclease A, em 1969, por R. Gutte e R. B. Merrifield, que utilizaram métodos em fase sólida²⁵. Um ano depois, as estruturas moleculares de diversas enzimas foram estabelecidas, o que permitiu avançar nos estudos de mecanismos de ação.

Ainda com fundamento empírico, a utilização escalonada de micro-organismos e de enzimas para obtenção de produtos com valor comercial estabeleceu-se antes mesmo de haver uma compreensão científica mais completa da natureza e do comportamento desses agentes biológicos aplicados a conversões químicas. O protótipo do primeiro biorreator já teria sido construído na França em 1823, com base na imobilização de bactérias para a produção de vinagre por fermentação oxidativa²⁶⁻²⁸. O primeiro exemplo de produção industrial com base em fermentação do qual se tem registro foi a do ácido láctico oticamente ativo, em 1880, nos Estados Unidos^{13,29}.

A perspectiva de produção de moléculas com valor agregado pela via dos micro-organismos começou a se concretizar na década de 1920, a partir dos resultados de alguns experimentos que produziram moléculas então de alto interesse farmacêutico. Entre esses estavam: a obtenção estereoespecífica da 1-hidroxi-1-fenilpropan-2-ona pela condensação de duas moléculas distintas, promovida por *Saccharomyces cerevisiae*³⁰; a oxidação controlada do D-sorbitol em L-sorbose³¹; e a conversão da progesterona em 11 α -hidroxiprogesterona pelo fungo parasita de frutos e vegetais maduros, o *Rhizopus arrhizus*, em presença de oxigênio³². A primeira dessas moléculas abriu caminho para a produção da efedrina, um dos mais antigos medicamentos para problemas do trato respiratório, pela empresa alemã Knoll AG, em 1930¹³. Na mesma época, a empresa Reichstein-Grüssner A estabeleceu um processo para obter a L-sorbose, este um intermediário-chave no processo de produção da vitamina C (ácido ascórbico)¹³. A progesterona hidroxilada estereoespecificamente na posição C-11 pela via microbiana representou uma economia considerável na obtenção desse intermediário-chave na síntese do anti-inflamatório cortisona³³. Esses três exemplos estão sintetizados na Figura 4.7.

Quanto à utilização de enzimas para proceder a conversões químicas, é digno de nota o fato de que, mesmo antes das evidências obtidas por Buchner, a comercialização de uma enzima extracelular alcançou o aumento de escala e a comercialização, por volta de 1890, graças ao empreendedor japonês Takamine, radicado nos Estados Unidos. Seu produto era uma mistura

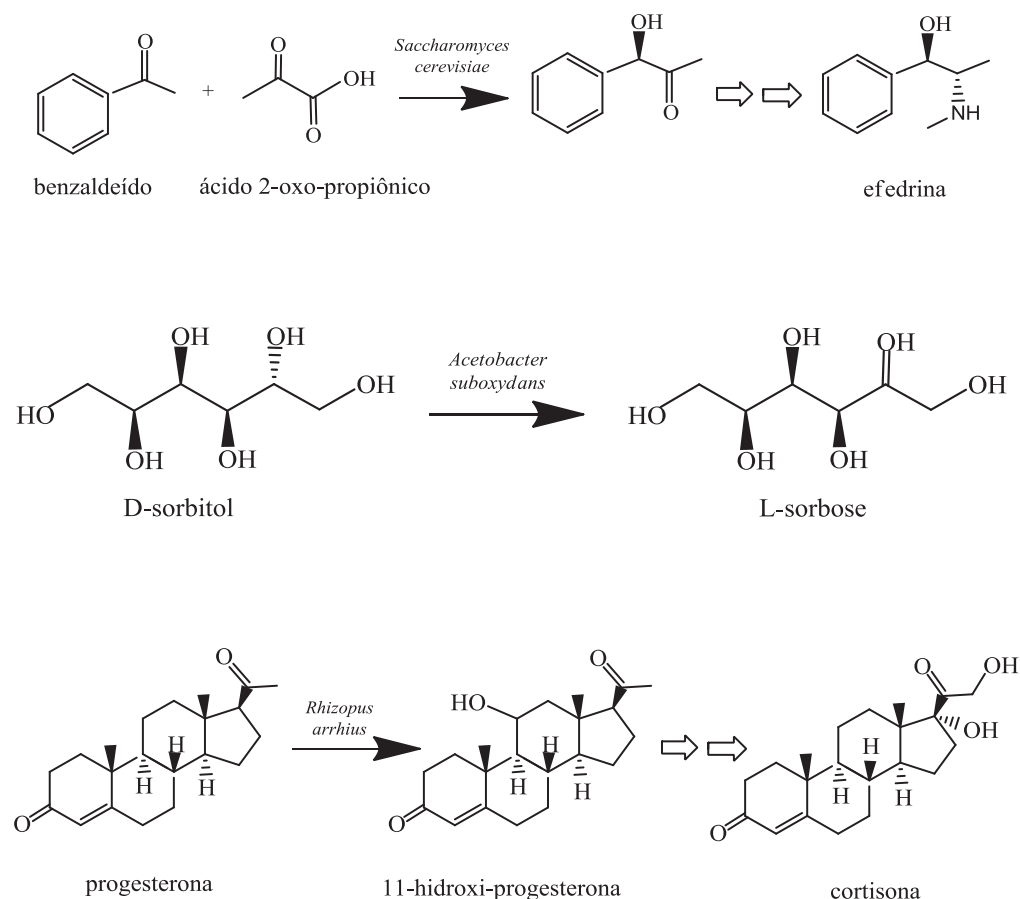


Figura 4.7 Biotransformações que deram suporte aos primeiros processos industriais do século XX (figura elaborada com base em Vasic-Racki, 2006¹³).

de enzimas amilolíticas e proteolíticas de *Aspergillus oryzae* – que ele denominou takadiastase¹³.

Se a década de 1920 assistiu à bioconversão industrial por células íntegras, os processos de conversão enzimática em larga escala seriam expandidos exponencialmente depois da metade do século XX, com o estabelecimento das ferramentas de recombinação genética.

Os quadros das figuras 4.8 e 4.9 sumarizam os eventos históricos relevantes no desenvolvimento dos processos de bioconversão, ao demarcar as pesquisas realizadas com micro-organismos e com enzimas isoladas, respectivamente.

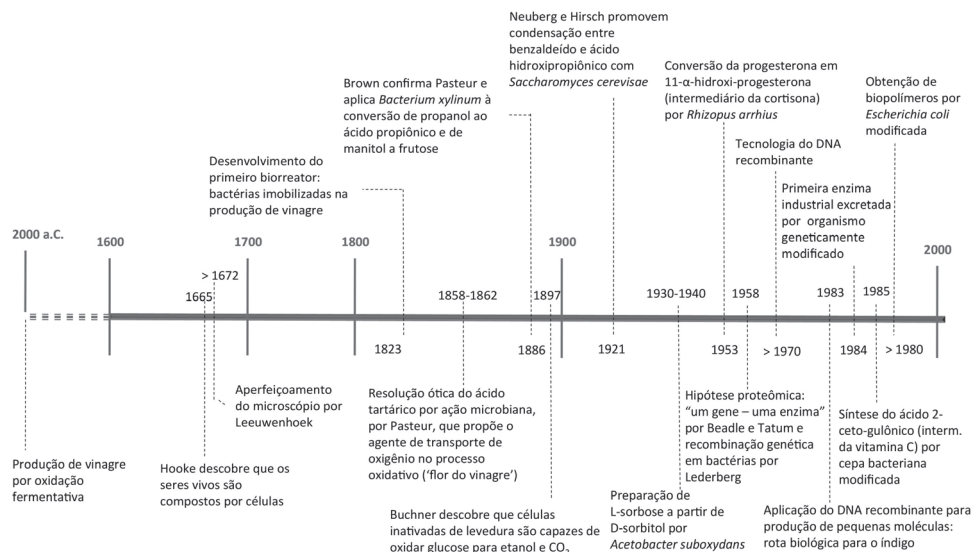


Figura 4.8 Marcos no desenvolvimento tecnológico da bioconversão utilizando micro-organismos. Figura elaborada com base em Vasic-Racki, 2006¹³.

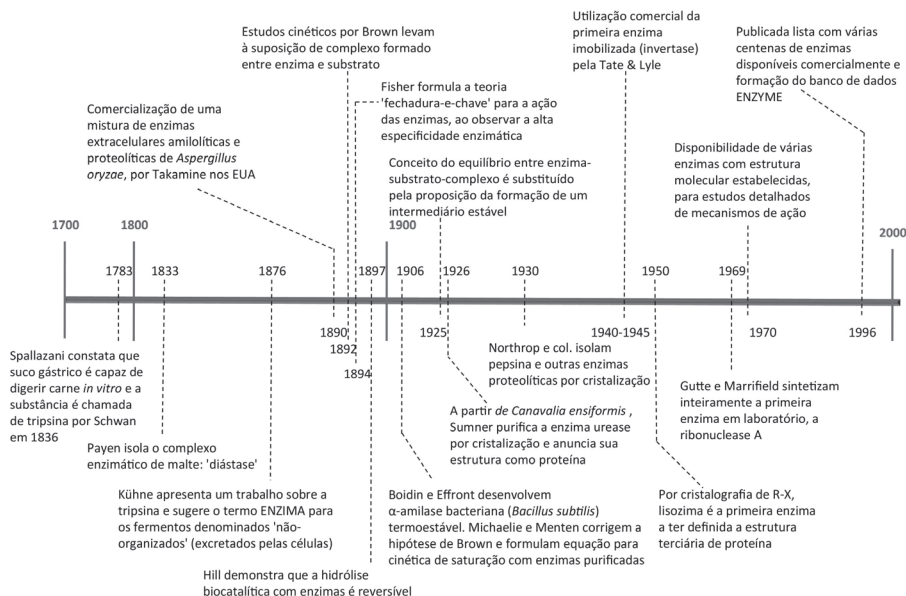


Figura 4.9 Marcos no desenvolvimento tecnológico da bioconversão utilizando enzimas. Figura elaborada com base em Vasic-Racki, 2006¹³.

4.3 FUNDAMENTOS DA BIOCONVERSÃO

4.3.1 Uso de células íntegras ou de enzimas isoladas

Os processos de bioconversão podem utilizar células íntegras ou enzimas isoladas, podendo ambas estar na forma livre ou imobilizada. O uso de células íntegras para a bioconversão apresenta as seguintes vantagens^{2,5,9,34-37}:

- menor custo, por evitar as etapas de isolamento e purificação do biocatalisador;
- maior estabilidade do biocatalisador, pois o ambiente celular protege a enzima das condições reacionais externas, que podem ser prejudiciais para a sua estabilidade; a capacidade de regeneração de cofatores, essencial para reações de oxidorredução; e
- possibilidade de realização de reações sequenciais.

As principais desvantagens são:

- toxicidade de substratos e produtos, exigindo altas diluições;
- ocorrência de reações laterais, que podem causar a degradação do substrato ou do produto;
- excreção de metabólitos que podem dificultar a etapa de purificação; e
- maior dificuldade de controle e reprodutibilidade do processo.

Dependendo do sistema enzimático de interesse, as células a serem utilizadas nas reações de bioconversão podem estar viáveis ou não e ainda terem sido colhidas na fase de crescimento exponencial ou na fase estacionária. Isso porque existem diferenças no metabolismo das células e no padrão de expressão de genes que são peculiares para as diversas fases do ciclo celular. No caso de biotransformações envolvendo reações de oxidorredução, é necessário utilizar células viáveis, que são capazes de regenerar os cofatores. A realização dessas reações, de grande interesse na indústria química, exige a presença de uma fonte de elétrons, por exemplo, a glicose, ou de um receptor de elétrons, como o oxigênio^{2,11,12}.

Por sua vez, as vantagens da utilização de enzimas isoladas são:

- requerimento de reatores mais simples;

- etapas de purificação de produto mais simples; maior tolerância ao uso de solventes orgânicos; e
- minimização de problemas de contaminação com outras enzimas.

Já as desvantagens incluem:

- elevado custo das enzimas comerciais; e
- maior dificuldade de realização de reações sequenciais.

É importante mencionar que, para caso de reações de oxidorredução, existem estratégias para a regeneração de cofatores, conforme será abordado mais adiante.

4.3.2 Estratégias para superar limitações dos processos de bioconversão

À parte a disponibilidade e custo das enzimas, de forma geral, os processos de bioconversão apresentam limitações relacionadas à baixa solubilidade no meio aquoso (em que se localizam os sistemas biológicos) de grande parte dos substratos e produtos de interesse; a possibilidade de inibição da reação pelo substrato ou pelo produto; a instabilidade e falta de flexibilidade do biocatalisador; a baixa concentração do produto; os baixos rendimentos; e a baixa produtividade¹².

Diversas estratégias podem ser empregadas para contornar essas limitações. A solubilidade aquosa de substratos, por exemplo, pode ser aumentada pela adição de detergentes (por exemplo, *tween*, entre outros) ou de solventes orgânicos imiscíveis com água (como metanol, etanol, acetona, isopropanol, dimetilformamida) ao meio reacional. Esses componentes, entretanto, devem ser cuidadosamente escolhidos de forma a não causarem toxicidade ou inibição ao biocatalisador. O uso de sistemas reacionais em duas fases, pelo emprego de solventes orgânicos apolares (por exemplo, tolueno, ciclohexano, éter metil-*t*-butílico), permite que substratos e produtos apolares sejam fornecidos ou retirados gradativamente do meio aquoso, diminuindo assim seus possíveis efeitos tóxicos ou inibidores ao biocatalisador. Além disso, o uso de duas fases permite separar de maneira relativamente fácil o catalisador, ao final do processo, uma vez que este permanece na fase aquosa, e reduzir o risco de contaminação microbiana. As desvantagens associadas a esse tipo de abordagem incluem: possibilidade de ação

tóxica, inibitória ou desnaturante sobre o biocatalisador; maior complexidade do sistema operacional; possibilidade de formação de emulsão, que dificultaria a recuperação do produto; e maior dificuldade de tratamento dos efluentes^{1,12,38}. A aplicação de sistemas de bioconversão na presença de solventes orgânicos é vasta, incluindo: síntese de peptídeos catalisada por proteases (quimiotripsina, termolisina ou tripsina); esterificação utilizando lipases; síntese de compostos quirais catalisada por lipases ou leveduras; desidrogenação de esteroides por desidrogenases ou células de bactéria, entre inúmeras outras³⁸.

Os processos de bioconversão podem ainda ser favorecidos com a utilização dos chamados líquidos iônicos (LI), sais formados por cátions e ânions orgânicos ou inorgânicos líquidos a temperatura ambiente. Os LIs formam sistemas bifásicos com sistemas aquosos, fazendo o papel dos solventes orgânicos tradicionais e têm sido chamados de “solventes verdes” devido à baixa toxicidade e interessantes propriedades físicas e químicas, tais como a pressão de vapor desprezível, elevada estabilidade e baixo risco de explosão, o que possibilita a reciclagem do solvente no processo industrial³⁹⁻⁴¹. Adicionalmente, os LIs podem ser modificados com relativa facilidade, de acordo com seus íons e suas cadeias laterais, gerando uma gama muito grande de possibilidades, já que suas propriedades físicas e químicas também variarão conforme as alterações moleculares⁴¹. Os processos de bioconversão de substâncias apolares catalisados por células em meio aquoso empregam geralmente LIs hidrofóbicos, como o hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF₆) e o bis-(trifluorometanosulfonil)imidato de butilimidazólio (BMI.NTf₂) (Figura 4.10)⁴². Em que pese o custo ainda bastante

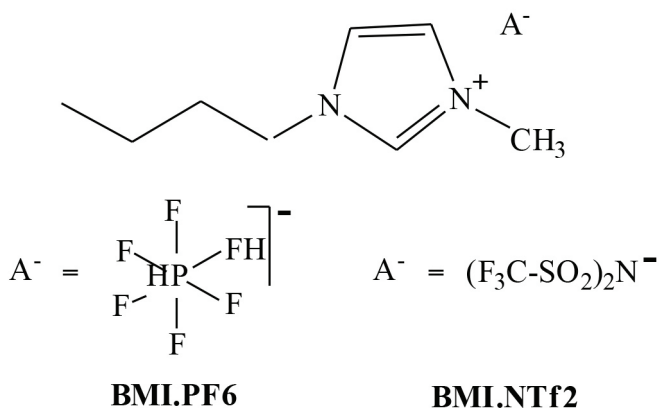


Figura 4.10 Estruturas químicas dos líquidos iônicos BMI.PF₆ e BMI.NTf₂.

elevado dos LIs, seu uso em processos de bioconversão tem despertado um crescente interesse nos pesquisadores⁴³⁻⁴⁶.

Para o caso de substratos tóxicos ou que causem inibição ao sistema enzimático, utilizam-se também processos em batelada alimentada, no qual o substrato é adicionado gradativamente ao reator. Por seu lado, produtos deletérios podem ser removidos *in situ* através do uso, por exemplo, de resinas adsorventes⁴⁷.

Outra ferramenta que tem se mostrado bastante útil em aplicações industriais por possibilitar o aumento da estabilidade do biocatalisador e facilitar a sua separação do meio reacional é a imobilização do catalisador. A imobilização de células ou enzimas pode ser efetuada através de ligação química covalente, adsorção ou interação iônica com um suporte inerte, como esferas de vidro, bem como através de encapsulação em matrizes ou incorporação em membranas, como ágar, K-carragenina, alginato, pectina ou poliacrilamida^{1,43,48-51}. Alguns aspectos importantes devem ser levados em conta, de forma que esse procedimento represente uma economia no custo global do processo; entre eles o custo da imobilização, a recuperação da atividade enzimática após imobilização do catalisador, a meia-vida operacional do biocatalisador imobilizado e os efeitos de transferência de massa^{9,48,49}.

4.3.3 Regeneração de cofatores em reações de oxidorredução com enzimas isoladas

A regeneração de cofatores em processos de oxidorredução catalisados por enzimas isoladas é de extrema importância devido ao alto custo e baixa disponibilidade dos cofatores, que impedem o seu uso em quantidades estequiométricas. Diversos sistemas de regeneração de cofator foram desenvolvidos utilizando métodos químicos, eletroquímicos e fotoquímicos. No entanto, os métodos enzimáticos são os predominantes, devido a requisitos rigorosos de seletividade e compatibilidade com a reação de interesse.

A regeneração de cofatores por métodos enzimáticos pode ser efetuada pelo uso de sistemas com substratos acoplados, nos quais além do substrato que leva ao produto principal, emprega-se também um cossustrato para regenerar o cofator; ou sistemas que contenham enzimas acopladas, nos quais a reação principal e a reação de reciclagem do cofator são catalisadas por enzimas diferentes.

No caso de sistemas com substratos acoplados, utiliza-se geralmente, como cossustrato, um álcool secundário de baixo custo, como o isopropanol. O

cossustrato pode também atuar como um solvente do substrato principal, já que seu largo excesso colabora para deslocar o equilíbrio da reação no sentido desejado. Deve-se notar, entretanto, que a concentração do cossustrato é limitada pela estabilidade da enzima na sua presença ou pela possibilidade de inibição da reação principal. A principal desvantagem desses sistemas é a sua baixa flexibilidade.

Os sistemas com enzimas acopladas apresentam como vantagem a maior flexibilidade da reação de reciclagem e a menor probabilidade de inibição da reação principal pelo cossustrato e pelo coproduto. A reação de reciclagem deve preferencialmente proceder de maneira irreversível, para favorecer a termodinâmica do sistema. Assim, a velocidade da reação principal será a limitante do sistema.

Os critérios de escolha da reação de reciclagem incluem o uso de substratos e enzimas de baixo custo, a facilidade de remoção do coproduto (por exemplo, CO_2), além da possibilidade de esse procedimento gerar um produto de interesse. De qualquer maneira, essa reação também não deve comprometer o rendimento ou a pureza ótica do produto da reação principal e o cossustrato e o coproduto não devem dificultar o processo de recuperação do produto principal⁵²⁻⁵⁵.

4.3.4 Etapas do desenvolvimento de um processo biocatalítico

O desenvolvimento de um processo biocatalítico tem caráter essencialmente multidisciplinar. A capacidade de transformar, de forma eficiente e economicamente viável, uma molécula precursora em um produto de alto valor agregado envolve múltiplas etapas, as quais incluem a seleção, caracterização e otimização do biocatalisador (micro-organismos, célula vegetal ou enzima isolada), o desenvolvimento e otimização do bioprocesso em si e o desenvolvimento do processo de recuperação do produto (Figura 4.11).

A fonte primária de todas as enzimas é o código genético das células de micro-organismos, animais e plantas. Assim, muitas enzimas de uso industrial ainda são extraídas de tecidos animais e vegetais e, majoritariamente, são obtidas por fermentação microbiana. No caso de enzimas microbianas, a primeira etapa para obtê-las consiste na identificação do micro-organismo produtor. A linhagem de interesse pode ser adquirida de uma coleção de culturas ou selecionada a partir de amostras de solo, água, ar, tecidos vegetais, tecidos animais e outras fontes⁵⁶. Nesse contexto, os recursos oriundos da

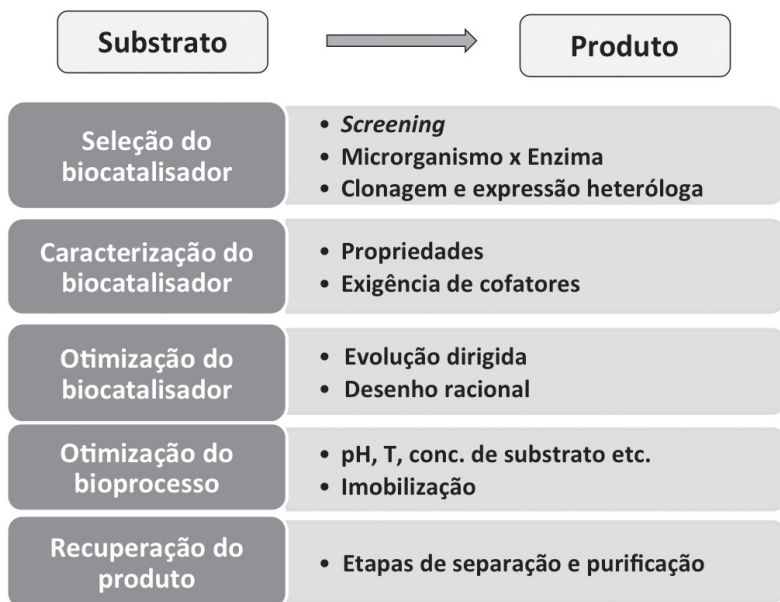


Figura 4.11 Etapas envolvidas no desenvolvimento de um processo biocatalítico.

biodiversidade representam um manancial inesgotável para impulsionar as pesquisas nesta área.

A partir das fontes primárias, ferramentas poderosas como a metagenômica, proteômica e bionformática podem ser utilizadas na construção de bancos de genes que codificam diferentes enzimas, visando a sua produção em grandes quantidades através de clonagem e expressão⁵⁸. A obtenção de catalisadores de interesse industrial está atualmente muito facilitada pelo uso de técnicas de biologia molecular. Assim, uma vez identificada uma enzima de interesse, seu gene pode ser clonado, preferencialmente em leveduras e bactérias, e a proteína catalítica ser expressa em grandes quantidades^{57,58}.

A etapa seguinte é a caracterização da enzima quanto às suas propriedades bioquímicas, condições ambientais de atuação, exigência de cofatores, identificação de possíveis ativadores e inibidores, estabilidade etc.

As propriedades do biocatalisador de interesse podem ser melhoradas, alcançando-se maior estabilidade operacional e habilidades catalíticas específicas, através do emprego de técnicas avançadas de evolução dirigida (mimetização do darwinismo *in vitro*, combinando mutação com seleção de variantes com as propriedades desejadas) e de desenho racional (mutações

sítio-dirigidas com o intuito de trocar com precisão certos aminoácidos da enzima), aproximando ainda mais a biocatálise do setor industrial^{1,36,38,58}.

A otimização de um processo bioquímico, microbiano ou enzimático, para obtenção do máximo rendimento em produto e produtividade, é uma tarefa complexa. Tradicionalmente, são empregadas abordagens empíricas, nas quais são investigados efeitos da formulação do meio reacional (concentração de substrato, concentração do biocatalisador, presença/concentração de aditivos, força iônica, eventual presença de solventes orgânicos) e dos parâmetros operacionais (pH, temperatura, tempo, aeração e outros). Os principais inconvenientes desse tipo de abordagem são o grande número de experimentos necessários, a grande demanda de tempo e, principalmente, o fato de os fatores serem investigados individualmente, ignorando-se os efeitos interativos entre eles. Porquanto, é crescente a aplicação, com sucesso, de métodos estatísticos na otimização de bioprocessos. Usualmente, numa primeira etapa os principais parâmetros são selecionados e, a seguir, combinados em faixas mínimas e máximas, de acordo com ferramentas estatísticas (planejamento fatorial), que permitem considerar muitas variáveis envolvidas de maneira simultânea. Avaliando-se estatisticamente as respostas pré-selecionadas para traduzir a eficiência do processo, é possível aplicarem-se várias etapas sequenciais de planejamento experimental. Observando-se as tendências assumidas pelo processo a partir da influência de cada variável e das possíveis combinações entre elas, pode-se refinar paulatinamente os resultados em direção à otimização do processo⁵⁹⁻⁶².

A recuperação e purificação do produto, especialmente os de uso farmacêutico, representa uma das etapas de maior custo, podendo chegar a 75% do valor total¹⁰. A definição das operações dessa etapa depende de muitos fatores, como: tipo de bioconversão (microbiana, enzimática, biocatalisador livre ou imobilizado); características do produto (tamanho da molécula, concentração, solubilidade, polaridade, volatilidade, entre outras); propriedades físico-químicas do meio reacional (viscosidade, densidade, presença de impurezas e partículas indesejáveis); grau de pureza requerida; e forma final do produto (liofilizado, cristalizado, sólido, líquido concentrado etc.)^{51,63,64}.

O cumprimento das etapas da Figura 4.11 revela a relativa complexidade técnica envolvida no uso da tecnologia enzimática ou microbiana em processos de bioconversão. No entanto, dada a constante pressão pela inovação e a busca de alternativas para os poluentes e encarecidos derivados do petróleo, cada vez mais as grandes companhias químicas têm envidado esforços para estabelecer competitividade nesse setor.

4.4 CENÁRIO INDUSTRIAL

4.4.1 Aplicações industriais precedentes

O alicerce científico que permitiu estabelecer bases para os maiores avanços industriais na bioconversão do século XX foram duas descobertas simultâneas realizadas no final dos anos 1950: aquela feita por G. Beadle e E. L. Tatum, que demonstrou que cada enzima produzida por um organismo estava condicionada a um gene específico (hipótese “um gene \times uma enzima”); e a de J. Lederberg, sobre as possibilidades de recombinação genética e a organização genética das bactérias^{13,65}. Ambas deram suporte para a descoberta do DNA recombinante por S. N. Cohen e H. Boyer em 1973⁶⁶, que gerou a engenharia genética e as possibilidades de clonagem. Essa tecnologia foi rapidamente absorvida nos processos de transformações microbianos, inicialmente para a produção de pequenas moléculas.

Em 1984, a Novozymes desenvolveu uma amilase maltogênica (Maltogenase®) como a primeira enzima para uso na indústria de amido obtida de um organismo geneticamente modificado¹³. Em seguida, uma cepa de bactéria foi modificada geneticamente para produzir o ácido 2-ceto-L-gulônico, projetando uma rota bem mais curta para a vitamina C do que aquela estabelecida cinquenta anos antes a partir do D-sorbitol⁶⁷. Essa se tornou a base para o desenvolvimento da planta de produção estabelecida em 1999 na Alemanha pela BASF, Merck e Cerestar, que fermentava o sorbitol diretamente para 2-ceto-L-gulônico⁶⁸. A tecnologia enzimática ainda foi aplicada na produção da acrilamida e da L-carnitina¹, estabelecidas pela Nitto Chemical Ltd (Japão) e pela Lonza (República Tcheca), respectivamente. A primeira dessas moléculas é comercializada como *commodity*, atingindo o amplo mercado de produtos de aditivos e agentes floclulantes em geral. O processo desenvolvido em sua obtenção envolve a conversão por *Rhodococcus* sp., numa reação suave, com 100% de rendimento, além de outras vantagens inerentes a um processo limpo e sustentável. Em resumo, na segunda metade do século XX, um painel com uma dezena de pequenas moléculas obtidas por biotransformação realizada por células íntegras estava disponibilizado por sete grandes empresas (Figura 4.12)¹³.

Um setor que rapidamente ganhou importância dentro dos bioprocessos foi a produção de polímeros, com a emblemática obtenção do poli-hidroxi-butirato, um polímero de alto valor agregado devido à sua aplicação médica. É obtido pela fermentação de *Escherichia coli* modificada geneticamente

para expressar a biossíntese desse composto⁶⁹. O polímero, denominado “Biopol”, possui uma tecnologia de produção altamente econômica, detida pela Zeneca Bio Products.

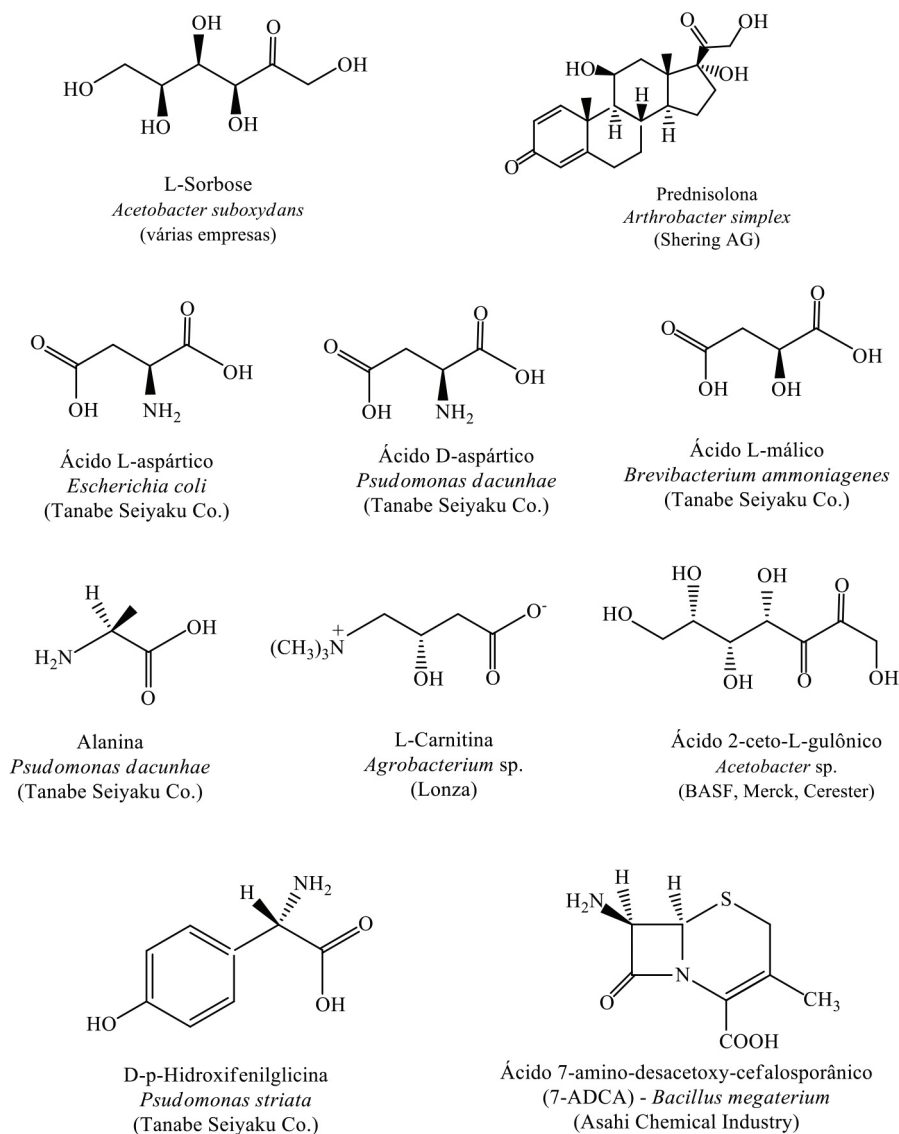


Figura 4.12 Moléculas com produção industrial por bioconversões catalisadas por células íntegras, na segunda metade do século XX. Figura elaborada com base em Vasic-Racki, 2006¹³.

Por seu lado, a aplicação de enzimas em processos industriais mais recentes tem seu marco inicial na produção do *golden syrup* (“xarope dourado”) pela companhia inglesa Tate & Lyle, durante a Segunda Grande Guerra, utilizando uma invertase adsorvida em carvão animal⁷⁰. O produto é uma mistura de glicose e frutose (1,5 vezes mais doce que a sacarose) originada pela inversão da sacarose induzida por uma enzima, que então substituiu o papel hidrolítico do ácido sulfúrico sobre o dissacarídeo. Esse pode ter sido também o primeiro uso industrial de uma enzima imobilizada. Poucos anos depois, ocorreu a produção de aminoácidos a partir da ação hidrolítica da aminoacilase sobre aminoácidos acilados. Essa enzima também era imobilizada em uma fase contendo Sephadex e empacotada no biorreator⁷¹. Em

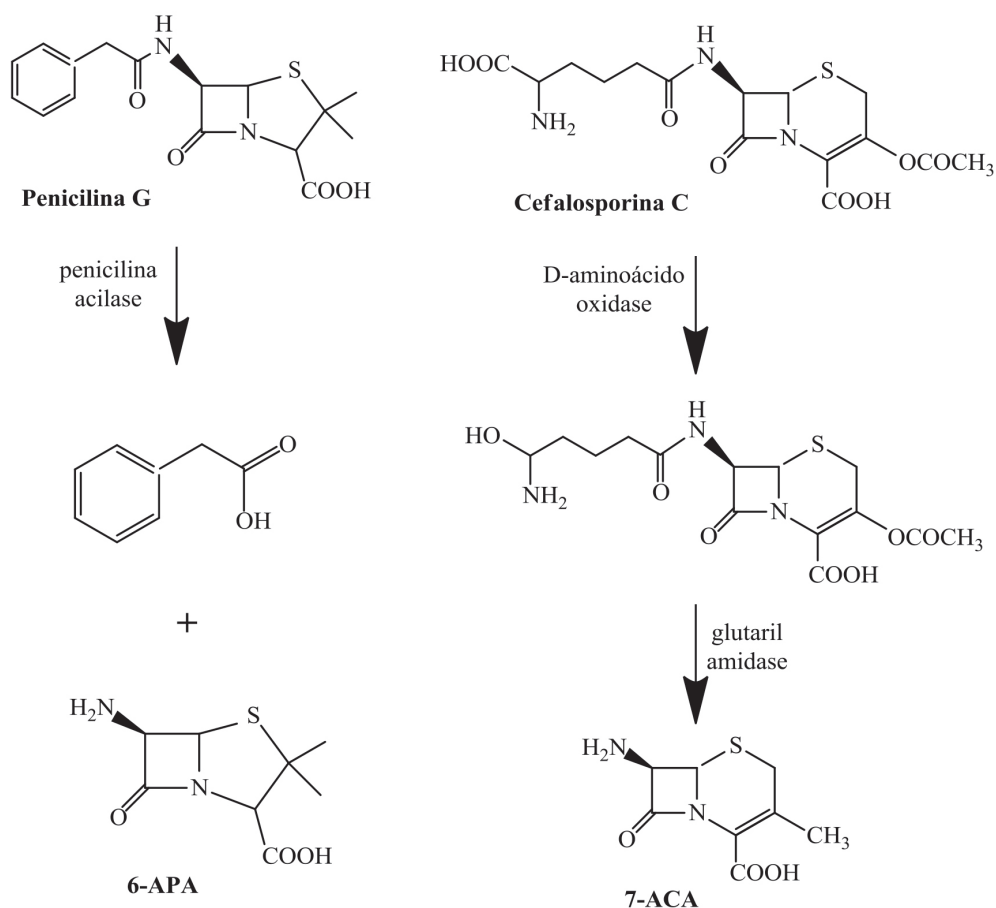


Figura 4.13 Obtenção dos precursores β -lactâmicos 6-APA e 7-APA por via enzimática.

1966, a mesma empresa japonesa que desenvolveu o uso da aminoacilase, a Tanabe Seiyaku, refinou o processo e aumentou a proporção de frutoses nos xaropes, por intermédio da ação da glicose isomerase sobre α -D-glicose. Um ano depois, a Clinton Corn Processing Company introduziu no mercado um “xarope dourado” inteiramente obtido por ação enzimática sobre o xarope bruto de milho⁷¹.

As crescentes tentativas de imobilizar enzimas, inicialmente para a produção de aminoácidos, viriam a contribuir também para os avanços da engenharia dos bioprocessos, levando, por exemplo, à projeção de sistemas de reator com membrana, na Alemanha, na década de 1980⁷². As possibilidades de filtrações seletivas em pontos estratégicos do fluxo operacional da bioconversão traz uma série de vantagens aos processos e produtos finais.

Paralelamente, outros avanços na engenharia deveram-se à necessidade de acoplar aos bioprocessos as operações de separação e purificação de produtos. Por exemplo, os sucessivos enriquecimentos do “xarope dourado” em frutose levaram à purificação dessa substância por cristalização e, posteriormente, ao surgimento de uma enzima comercial, imobilizada e altamente estável, a “Sweetzyme T”. Esta é produzida pela empresa dinamarquesa Novo para aplicação na indústria de amidos, visando produzir xaropes com altos teores de frutose¹³. Outro exemplo de sucesso de enzima imobilizada é a lactase, obtida de levedura, que hidrolisa a lactose (de baixa solubilidade e pouco doce) para uma mistura de glicose e galactose. Esse processo permitiu que uma companhia italiana situada em Milão fosse a primeira a comercializar leite livre de lactose⁷³.

Na área farmacêutica, o exemplo mais proeminente é sem dúvida a produção dos intermediários ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) e ácido 7-amino-desacetoxicefalosporânico (7-ADCA). Trata-se de três moléculas-chaves para a semissíntese de inúmeros derivados de antibióticos β -lactâmicos, nos processos de busca por moléculas mais efetivas ou de mais amplo espectro contra patógenos cada vez mais resistentes. O processo hoje em voga para produzir 6-APA é o mesmo de cinquenta anos atrás e envolve a ação da penicilina acilase sobre a penicilina G ou V. O 7-ACA é obtido usando-se como material de partida a cefalosporina C e seu tratamento sequencial é operacionalmente controlado com duas enzimas distintas, conforme foi desenvolvido pela parceria entre as empresas japonesas Toyo Jozo e a Asahi Chemical Industry (Figura 4.13)⁷⁰. Em ambas as etapas, as vantagens econômicas e ambientais são enormes.

4.4.2 Possibilidades industriais

Ainda nos dias de hoje, considera-se que o trabalho de desenvolver um bioprocessos e conduzi-lo apropriadamente à produção e comercialização de algum insumo pode demorar até vinte anos^{1,13,74}. Mesmo com esse panorama, os exemplos de processos desenvolvidos na metade final do século XX multiplicaram-se para alcançar, até 2006, mais de 150 processos estabelecidos em escala industrial¹³. Parte das razões desse crescimento, em menor período de tempo, é o próprio acúmulo de *know-how* naturalmente decorrente dos esforços precedentes em transformar resultados de pesquisas em tecnologias viáveis. Há que considerar também as frequentes inovações incrementais, relacionadas a reações específicas e materiais diversos envolvidos nas várias etapas que compõem os processos catalíticos (Figura 4.11). Complementarmente, a engenharia dos bioprocessos deve considerar os fundamentos científicos da engenharia voltados para desenvolver processos, produtos e serviços relacionados à indústria química e farmacêutica, de maneira racional, sustentável e segura. Além disso, sempre é fundamental, para uma indústria, a redução de custos de seus processos, de maneira geral.

Em termos de volume de produção, o mercado atual é representado por produtos resultantes de bioconversões voltadas para a área de alimentos, principalmente a produção de carboidratos, que ultrapassa 10.000 ton/ano. Logo em seguida aparecem a acrilamida (monômero) e o intermediário 6-APA, com produções que modulam entre 100 ton/ano e 10.000 ton/ano, considerando-se as dezenas de processos de bioconversões existentes. Já em termos de diversidade molecular, a maioria das bioconversões industriais gera produtos para a química fina, apontando para o setor farmacêutico (com alguma inserção de cosméticos) como o principal responsável por essa demanda¹¹. Em termos de valor agregado, as moléculas de apelo farmacêutico – que atuarão como princípios ativos em medicamentos ou em intermediários para obtê-los –, ainda que produzidas em menor volume, contrabalançam os valores gerados pelos produtos destinados ao mercado de alimentos.

Existe também o mercado específico das enzimas. Por exemplo, as hidrolases são as enzimas mais utilizadas na biotransformação industrial, considerando-se suas subclasses de lipases, proteases, amidases e glicosidases, destinadas a produtos específicos para o mercado. Aqui, são relevantes a hidrólise dos polisacarídeos em açúcares monoméricos e a fabricação de acrilamida (hidrólise do grupo nitrila), que respondem por um mercado amplo. As liases e transferases também estão entre as mais utilizadas. Podem ser exploradas para construir

moléculas e criar centros quirais, e por isso são importantes nas sínteses assimétricas e de fármacos. Contudo, são usadas preferencialmente quando inseridas em células, já que assim os requisitos por ATP ou outros cofatores estarão preenchidos. Essa preferência por sistemas envolvendo células também se dá para as oxidorredutases, já que as células podem usar o metabolismo primário para regenerar os cofatores redox¹¹. Uma subclasse bastante importante de enzima são as monoxigenases, capazes de catalisar, de forma eficiente e específica, a inserção de um átomo de oxigênio em cadeias alifáticas de compostos orgânicos, reação de difícil obtenção em síntese orgânica⁷⁵⁻⁷⁸.

Sem dúvida, o principal aspecto da aplicação de sistemas de bioconversão na área farmacêutica é a obtenção de compostos quirais de interesse. Assim, desidrogenases, dehalogenases, monoxigenases, dioxigenases, acilases, amidases, lipases, nitrilases, liases, epóxido-hidrolases, descarboxilases, hidantoinases, oxidorredutases, transaminases aldolases e catalase, entre outras, têm sido estudadas para: resolução de compostos racêmicos; síntese assimétrica de compostos quirais enriquecidos enantiomericamente; síntese de alcoóis, amino alcoóis, aminoácidos e aminas quirais; síntese assimétrica por condensação aldólica e condensação aciloínica; hidroxilação e epoxidação enantio e régio seletivas; síntese quimioenzimática de dióis quirais^{3,4,6,7,79,80}.

Um denominador comum à totalidade dos processos industriais com base em catálise enzimática é a busca da seletividade na bioconversão, que pode envolver aspectos de regiosseletividade e quiralidade. As possibilidades de aplicação dessa tecnologia são tão amplas quanto a gama de enzimas existentes, sejam elas já isoladas e disponíveis, incorporadas em micro-organismos ou expressadas por estes. O planejamento de uma bioconversão pode ser inferido a partir das etapas da Figura 4.11, avaliando-se a natureza do produto que se objetiva obter, na perspectiva das características gerais dos bioprocessos e suas modalidades. Assim, devem-se considerar, entre outros desdobramentos, as seguintes questões:

- seleção do sistema da bioconversão, com emprego de enzimas ou de células íntegras;
- planejamento para se atingir a eficiência ótima do processo selecionado (que pode ser ensaiado, numa etapa de prospecção);
- questões técnicas imediatas como condições reacionais, imobilização do agente bioconversor, custo e disponibilidade do catalisador, esforços necessários para separação e purificação do produto etc;
- requisitos de engenharia necessários para executar o projeto; e
- valor agregado do produto.

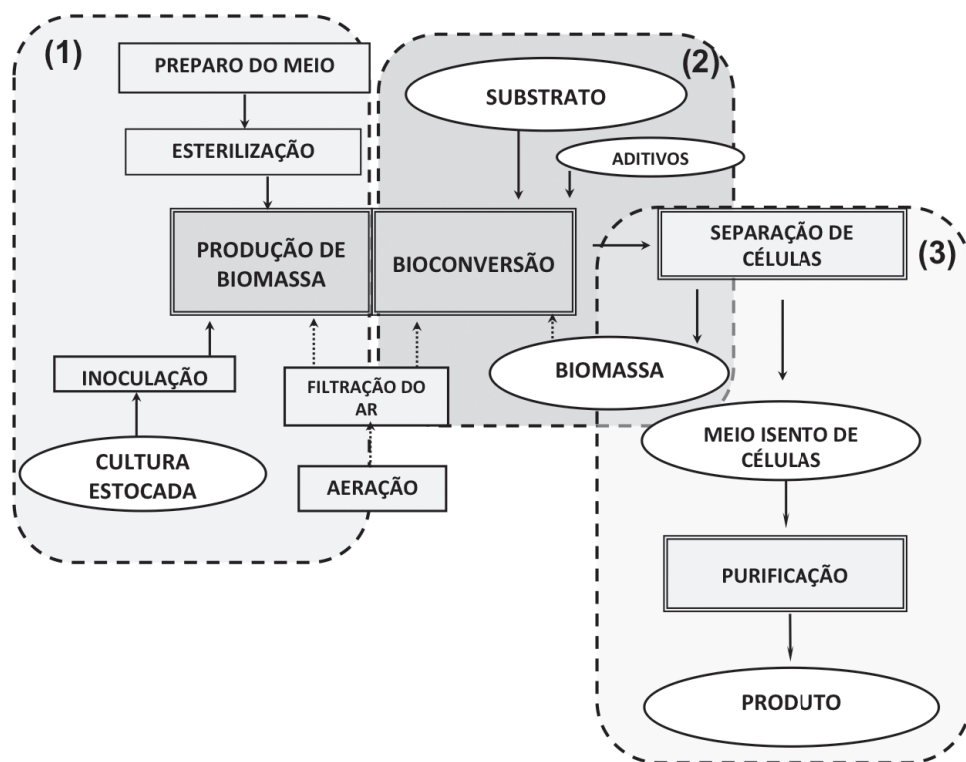


Figura 4.14 Representação esquemática de um processo de bioconversão microbiana: (1) produção de massa celular; (2) bioconversão; e (3) separação e purificação do produto.

Por fim, o custo-benefício do processo deve justificar os investimentos, o que implica em estratégias de inovação que extrapolam as questões técnicas, como conhecer processos competitivos, concorrentes, nichos de mercado etc.

4.5 PROTOCOLO GERAL PARA A TÉCNICA

Esta seção apresenta, de maneira resumida e esquemática, uma orientação geral para executar os processos de bioconversão, descrevendo de maneira genérica as etapas necessárias. Também são abordados apenas os casos com biocatalisador livre em sistemas aquosos. Obviamente, há cuidados que concernem às especificidades de cada processo reacional em particular.

Detalhamentos dos sistemas, como o emprego de diferentes enzimas etc., são cobertos pelas referências citadas ao longo do texto.

4.5.1 Bioconversão microbiana

O processo de bioconversão microbiana compreende diversas operações, as quais podem ser divididas em três conjuntos principais, representados pelos blocos na Figura 4.14: (1) a produção de massa celular; (2) o processo em si de bioconversão; e (3) as etapas de separação e purificação do produto.

O primeiro conjunto de operações consiste na produção de massa celular e compreende o preparo e a esterilização do meio de propagação, o preparo do inóculo e a produção celular propriamente dita.

É importante notar que a manutenção e a preservação dos micro-organismos são etapas de extrema importância para assegurar a sua viabilidade e prevenir mudanças genéticas que levem à redução ou perda de propriedades fenotípicas. Técnicas de manutenção e conservação de micro-organismos são descritas na literatura e incluem repicagens periódicas, conservação em parafina ou em glicerol, liofilização e crioconservação⁵⁹.

As características e necessidades nutricionais variam entre os micro-organismos, e aquelas do micro-organismo de interesse devem ser muito bem conhecidas para que a etapa de produção de biomassa seja cumprida com sucesso. De maneira geral, para o crescimento de um micro-organismo é necessário o suprimento de água, fontes de carbono e energia, nitrogênio, oxigênio, elementos minerais (fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, entre outros), elementos traços (manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo, níquel, cobalto, boro, entre outros); além de fatores de crescimento, quando necessários (certos aminoácidos, purinas, pirimidinas ou vitaminas que o micro-organismo em questão não seja capaz de sintetizar)^{81,82}. Para prevenir contaminações, o bioprocessamento é conduzido em condições assépticas. Dessa forma, o meio de cultura, assim como o ar (em processos aeróbicos), deve ser esterilizado antes de fornecido à cultura^{51,56,64,83}.

O crescimento microbiano pode ser realizado em cultivos submersos ou cultivos no estado sólido, sendo os primeiros os mais utilizados. Nesse caso, as fermentações são conduzidas em frascos agitados (em escala de laboratório) ou em biorreatores aerados e agitados mecanicamente, seja em escala de laboratório, piloto ou industrial. Os parâmetros operacionais, tais como pH, temperatura, consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono, devem ser medidos e controlados de maneira a garantir a manutenção das condições

ótimas de cultivo dos micro-organismos. Os bioprocessos submersos podem ser operados em modos de batelada simples, batelada alimentada ou condução contínua, visando atingir altos rendimentos e produtividade adequada em células. Fundamentos teóricos e aspectos práticos sobre cultivos de micro-organismos em escala de laboratório e industrial, incluindo todas as etapas envolvidas, estão amplamente descritos na literatura^{51,56,64,83}.

Uma vez obtido o biocatalisador (células íntegras), é então iniciada a etapa de bioconversão propriamente dita (etapa 2 da Figura 4.14). Caso haja necessidade de substituir o meio reacional utilizado no crescimento celular, a separação das células pode ser efetuada por centrifugação, filtração, sedimentação^{51,63,64}. Nesta etapa são adicionados o substrato a ser transformado, os aditivos específicos para a reação de interesse e, caso se trate de uma reação de oxidação, o suprimento de ar no reator. O pH, a temperatura e, eventualmente, a concentração de oxigênio dissolvido devem ser monitorados e corrigidos, de forma a garantir a manutenção das condições ótimas determinadas para o processo. Da mesma forma que o cultivo celular, a bioconversão pode ser operada nos modos de batelada simples,

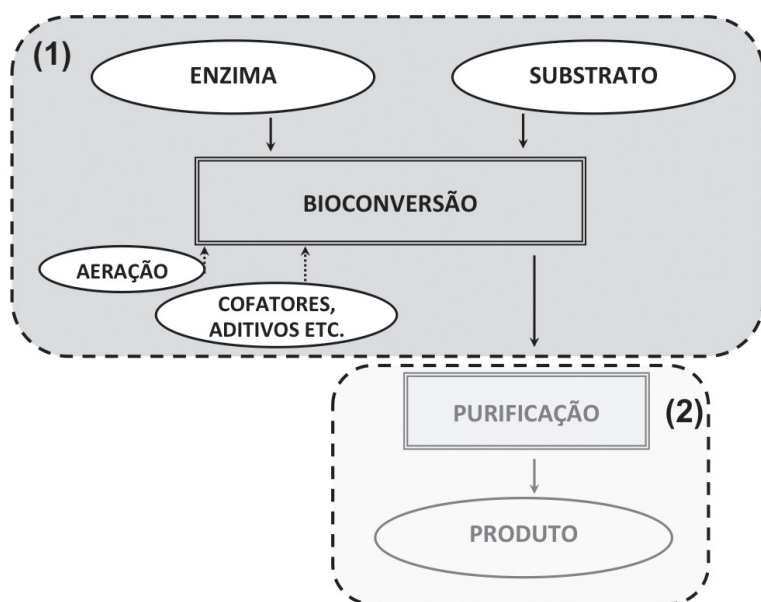


Figura 4.15 Representação esquemática de um processo de bioconversão enzimática. (1) Bioconversão; e (2) separação e purificação do produto.

batelada alimentada ou condução contínua, visando atingir altos rendimentos e produtividade.

Segue-se então o conjunto de etapas de isolamento e purificação do produto (etapa 3 da Figura 4.14), cujo primeiro passo é uma separação sólido-líquido para retirar as células, que podem ser recicladas para uma nova bioconversão. A etapa seguinte é a concentração do produto, realizada por precipitação, filtração em membranas ou extração líquido-líquido. Segue-se a etapa de purificação final, efetuada por cromatografia ou cristalização. Conforme já mencionado, as características físico-químicas do produto e do meio reacional, assim como o grau de pureza pretendido, irão determinar os procedimentos que serão adotados. A literatura especializada em bioprocessos descreve detalhadamente essas operações^{51,64,83}.

4.5.2 Bioconversão enzimática

O processo de bioconversão enzimática é bem mais simplificado quando comparado à bioconversão microbiana. A primeira compreende apenas as etapas de bioconversão propriamente dita, sendo complementada com o isolamento e purificação do produto final, subentendendo-se que o biocatalisador, constituído de enzima(s) isolada(s), foi adquirido no mercado ou produzido *in loco* em uma etapa separada (Figura 4.15). Detalhes sobre os múltiplos aspectos relacionados à produção de enzimas podem ser encontrados na literatura^{1,56}.

A diferença fundamental entre a bioconversão enzimática e a microbiana é que esta última contém partículas em suspensão (células microbianas), enquanto na primeira o catalisador está dissolvido no meio reacional. Todos os outros aspectos já abordados para a bioconversão microbiana se aplicam à enzimática.

4.6 PERSPECTIVAS

Apesar da importância fundamental que vem assumindo, a aplicação de processos de bioconversão em escala industrial está, contudo, em sua infância. O número de micro-organismos e sistemas enzimáticos avaliados até o momento ainda é ínfimo considerando-se o potencial existente. Ressalte-se também o custo ainda bastante elevado das enzimas disponíveis no mercado.

Assim, entre as ações que podem impulsionar a introdução de novas enzimas e organismos voltados para a finalidade da bioconversão, estão:

- Intensificar a triagem tradicional para identificar novos biocatalisadores promissores, a partir de buscas em nichos inexplorados da biodiversidade; o que inclui a prospecção de organismos extremófilos, que crescem em ambientes inóspitos.
- Combinar técnicas modernas de prospecção (*high throughput screening*) com ferramentas de bioinformática e metagenômica para acessar novas espécies microbianas e identificar novas enzimas.
- Utilizar ferramentas da biologia molecular (clonagem molecular, mutagênese dirigida ou randômica, evolução dirigida de biocatalisadores) para ampliar as possibilidades de recombinação genética e gerar, de maneira eficiente e com apelo industrial, micro-organismos e enzimas feitos “sob medida” (*tailor-made*) para aplicações específicas.
- Acumular informações sobre organismos-enzimas, agregando dados obtidos através de estudos sobre genomas, transcriptomas, proteomas e metabolomas.
- Estimular os estudos de predição estrutura-função, visando ampliar o acesso à variedade de enzimas para uso como ferramentas de síntese orgânica.
- Desenvolver novas e eficientes técnicas para reciclagem de cofatores.
- Incentivar estudos aplicados nas áreas de química e bioquímica de proteínas, assim como de engenharia bioquímica.

A necessidade do desenvolvimento autossustentável, que pressupõe o uso de matérias-primas renováveis por processos que gerem produtos de qualidade com tecnologias limpas, às crescentes regulamentações governamentais e o estímulo oferecido pelo preço crescente da energia e progresso científico nesta área deverão certamente impulsionar o desenvolvimento dessas novas tecnologias.

REFERÊNCIAS

1. Bommarius AS, Riebel-Bommarius BR. Biocatalysis: Fundamentals and Applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2007.
2. Ishige T, Honda K, Shimizu S. Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2005;9(2):174-80.
3. Loughlin WA. Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*. 2000;74(1):49-62.
4. Patel RN. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31(6):804-26.
5. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 2001;409(6817):258-68.
6. Fessner WD, Anthonsen T. Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2008.
7. Faber K. Biotransformations. U.S. Government Printing Office; 2000.
8. Meyer H-P, Ghisalba O, Leresche JE. Biotransformations and the Pharma Industry. *Handbook of Green Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2010.
9. Sanchez S, Demain AL. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research and Development*. 2011;15(1):224-30.
10. Kircher M. The pharmaceutical industry needs more innovation in bioprocesses. *Future Medicinal Chemistry*. 2011;3(14):1737-40.
11. Straathof AJJ. Quantitative Analysis of Industrial Biotransformation. In: Liese A, Seelbach K, Wandrey C, editors. *Industrial Biotransformations*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.
12. Straathof AJ, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(6):548-56.
13. Vasic-Racki D. History of Industrial Biotransformations-Dreams and Reality. In: Liese A, Seelbach K, Wandrey C, editors. *Industrial biotransformations*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. p. 1-36.
14. Pasteur L. Mémoire sur la fermentation de l'acide tartrique. *C. R. Académie des Sciences*. 1858;46:615-8.
15. Pasteur L. Suite a une precedente communication sur les mycodermes; nouveau procédé industriel de fabrication du vinaigre. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences*. 1862;55:28-32.
16. Sebek OK. Notes on historical development of microbial transformation. In: Rosazza JP, editor. *Microbial transformations of bioreactive compounds*. Boca Raton: CRC-Press; 1982. p. 2-6.

17. Perham RN. The protein chemistry of enzymes. FEBS letters. 1976;62(Suppl):E20-9.
18. Buchner E. Alkoholische garung ohne hefezellen. Ber Che Ges. 1897;30 (117):1110.
19. Fischer E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 1894;27(3):2985-93.
20. Fischer E. Synthesen in der Zuckergruppe II. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 1894;27(3):3189-232.
21. Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. Biochemistry. 2011 Oct 4;50(39):8264-9.
22. Briggs GE, Haldane JB. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. The Biochemical Journal. 1925;19(2):338-9.
23. Laidler KJ. A Brief History of Enzyme Kinetics. In: Cornish-Bowden A, editor. New Beer in an Old Bottle: Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge. Valencia: Universitat de València; 1997. p. 127-33.
24. Sumner JB. The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease: Preliminary Paper. Journal of Biological Chemistry. 1926;69(2):435-41.
25. Gutte B, Merrifield RB. Total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity. Journal of the American Chemical Society. 1969;91(2):501-2.
26. Mitchell CA. Vinegar: Its Manufacture and Examination. London: C. Griffin, Limited; 1926.
27. Mori A. Vinegar production in a fluidized bed reactor with imobilized bacteria. In: Tanaka A, Tosa T, Kobayashi T, editors. Industrial Application of Immobilized Biocatalysts. New York: Taylor & Francis; 1992. p. 291-313.
28. Ebner H, Sellmer S, Follmann H. Acetic acid. In: Rehm HJ, Reed G, Roehr M, editors. Biotechnology: Products of primary metabolism. Weinheim: VCH; 1996. p. 383.
29. Sheldon RA. Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds. New York: Taylor & Francis; 1993.
30. Neuberg C, Hirsch J. Über ein Kohlenstoffketen knüpfendes ferment (carboligase). Biochem Z. 1921;115:282-310.
31. Kluver AJ, de Leeuw FJG. Acetobacter suboxydans, een merkwaardige azijnbacterie. S.n.; 1923.
32. Peterson DH, Murray HC, Eppstein SH, Reineke LM, Weintraub A, Meister PD, et al. Microbiological Transformations of Steroids.1 I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. Journal of the American Chemical Society. 1952;74(23):5933-6.
33. Sebek OK, Perlman D. Microbial Transformation of Steroids and Sterols. In: Peppler HJ, Perlman D, editors. Microbial Technology: Microbial processes. New York: Academic Press; 1979. p. 484-8.
34. de Carvalho CCCR, da Fonseca MMR. Biotransformation of terpenes. Biotechnology Advances. 2006;24(2):134-42.

35. Wang Y-J, Zheng Y-G, Xue J-P, Shen Y-C. Microbial transformation of indole-3-acetonitrile to indole-3-acetamide by *Nocardia* sp. 108. *Process Biochemistry*. 2006;41(8):1746-50.
36. Carballeira JD, Quezada MA, Hoyos P, Simeo Y, Hernaiz MJ, Alcantara AR, et al. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnology Advances*. 2009;27(6):686-714.
37. Ferrara MA, Lacerda PSB, Freitas A, Bon EPS. Microbial bioconversion for pharmaceuticals and chiral intermediates. *Current Topics in Biotechnology*. 2007;3:57-65.
38. Fernandes P, Aires-Barros MR, Cabral JMS. Biocatálise Aplicada. In: Lima N, Mota M, editors. *Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: Lidel; 2003.
39. Olivier-Bourbigou H, Magna L, Morvan D. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. *Applied Catalysis A: General*. 2010;373(1-2):1-56.
40. Cull SG, Holbrey JD, Vargas-Mora V, Seddon KR, Lye GJ. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000;69(2):227-33.
41. Sureshkumar M, Lee C-K. Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009;60(1-2):1-12.
42. van Rantwijk F, Madeira Lau R, Sheldon RA. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(3):131-8.
43. Lou WY, Chen L, Zhang BB, Smith TJ, Zong MH. Using a water-immiscible ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4-(trimethylsilyl)-3-buten-2-one catalyzed by immobilized *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 cells. *BMC Biotechnology*. 2009;9:90.
44. Lue B-M, Guo Z, Xu X. Effect of room temperature ionic liquid structure on the enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*. 2010;45(8):1375-82.
45. Paula BRSD, Zampieri DS, Zukerman-Schpector J, Tiekink ERT, Rodrigues JAR, Moran PJS. Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes with ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate in ionic liquids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2012;23:825-30.
46. Zampieri DS, de Paula BRS, Zampieri LA, Vale JA, Rodrigues JAR, Moran PJS. Enhancements of enantio and diastereoselectivities in reduction of (Z)-3-halo-4-phenyl-3-buten-2-one mediated by microorganisms in ionic liquid/water biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013;85-86(0):61-4.
47. Mirata MA, Heerd D, Schrader J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. *Process Biochemistry*. 2009;44(7):764-71.
48. Castro HF, Zanin GM, Moraes FF, Sá-Pereira P. Imobilização de Enzimas e sua Estabilização. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro

RB, et al., editors. *Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

49. Hanefeld U. Immobilization as a Tool for Improving Enzymes. In: Fessner WD, Anthonsen T, editors. *Modern Biocatalysis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009. p. 21-41.

50. Thomsen MS, Nidetzky B. Continuous-Flow Microchannel Reactors with Surface-Immobilized Biocatalysts. In: Fessner WD, Anthonsen T, editors. *Modern Biocatalysis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009. p. 43-54.

51. Pereira Jr N, Bon EPS, Ferrara MA. *Tecnologia de Bioprocessos*. Pereira Jr N, editor. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ; 2008.

52. Abarzúa EGO, Andrade LH, Villela Filho M. Enzimas em Síntese Orgânica. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, et al., editors. *Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

53. Truppo MD. Cofactor Recycling for Enzyme Catalyzed Processes. In: Carreira EM, Yamamoto H, editors. *Comprehensive Chirality*. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 46-70.

54. Roche J, Groenen-Serrano K, Reynes O, Chauvet F, Tzedakis T. NADH regenerated using immobilized FDH in a continuously supplied reactor – Application to l-lactate synthesis. *Chemical Engineering Journal*. 2014;239:216-25.

55. Liu W, Wang P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology advances*. 2007;25(4):369-84.

56. Bon EPS, Pereira Jr. N, Gottschalk LMF, Sá-Pereira P, Roseiro JC, Ferrara MA. Bioprocessos para a Produção de Enzimas. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, et al., editors. *Enzimas em Biotecnologia Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

57. Torres FAG, Moraes LMP, Marco JL, Poças-Fonseca MJ, Felipe MSS. O Uso de Leveduras e Fungos Filamentosos para Expressão Heteróloga de Enzimas. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, et al., editors. *Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

58. Paiva CLA, Sá-Pereira P. A Aplicação da Biologia Molecular na Produção de Enzimas. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, et al., editors. *Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

59. Demain AL, Solomon NA. *Manual of Industrial Microbiology and Technology*. Washington: American Society for Microbiology; 1986.

60. Bicas J, Barros F, Wagner R, Godoy H, Pastore G. Optimization of R-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008;35(9):1061-70.

61. Rodrigues MI, Lemma AF. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão Editora; 2005.
62. Rottava I, Cortina PF, Martello E, Cansian RL, Toniazzi G, Antunes OA, et al. Optimization of alpha-Terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene and (-)-beta-pinene. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2011 Jun;164(4):514-23.
63. Aires-Barros MR, Cabral JMS. Biosseparações. In: Lima N, Mota M, editors. *Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: Lidel; 2003.
64. Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial*. Vol. 2. Engenharia Bioquímica. São Paulo: Blucher; 2001.
65. Beadle GW, Tatum EL. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1941;27(11):499-506.
66. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70(11):3240-4.
67. Anderson S, Marks CB, Lazarus R, Miller J, Stafford K, Seymour J, et al. Production of 2-Keto-L-Gulonate, an Intermediate in L-Ascorbate Synthesis, by a Genetically Modified *Erwinia herbicola*. *Science*. 1985;230(4722):144-9.
68. McCoy M. Chemical Makers Try Biotech Paths. *Chemical & Engineering News Archive*. 1998;76(25):13-9.
69. Martin DP, Williams SF. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*. 2003;16(2):97-105.
70. Cheetham PSJ. The application of enzymes in industry. In: Wiseman A, editor. *Handbook of enzyme biotechnology*. London: Ellis Horwood; 1995. p. 493-8.
71. Trevan MD. Immobilized enzymes: An introduction and applications in biotechnology. New York: John Wiley & Sons; 1980.
72. Bommarius AS, Drauz K, Groeger U, Wandrey C. Membrane Bioreactors for the Production of Enantiomerically Pure alpha-Amino Acids. In: Collins AN, Sheldrake GN, Crosby J, editors. *Chirality in Industry*. New York: John Wiley; 1992. p. 372-97.
73. Marconi W, Morisi F. Industrial Applications of Fiber-Entrapped Enzymes. In: Wingard LB, Katchalski-Katzir E, Goldstein L, editors. *Applied Biochemistry and Bioengineering*. Oxford: Academic Press; 1979. p. 219-58.
74. Ikemi M. Industrial chemicals: enzymatic transformation by recombinant microbes. *Bioprocess technology*. 1994;19:797-813.
75. Alphand V, Fraaije MW, Mihovilovic MD, Ottolina G. Second Generation Baeyer-Villiger Biocatalysts. *Modern Biocatalysis: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2009. p. 339-68.
76. Sakaki T. Practical application of cytochrome P450. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2012;35(6):844-9.

77. Torres Pazmiño DE, Winkler M, Glieder A, Fraaije MW. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of biotechnology*. 2010;146(1-2):9-24.
78. Schewe H, Mirata MA, Holtmann D, Schrader J. Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases. *Process Biochemistry*. 2011;46(10):1885-99.
79. Lacerda PSB, Ribeiro JB, Leite SGF, Ferrara MA, Coelho RB, Bon EPS, et al. Microbial reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate. Searching for R-enantioselectivity. New access to the enalapril like ACE inhibitors. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2006;17(8):1186-8.
80. Freire DMG, Castilho LR. Lipases em Biocatálise. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, et al., editors. *Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.
81. Madigan MT, Martinko JM, Stahl D, Clark DP. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings; 2012.
82. Borzani W, Schmidell W, Lima UA, Aquarone E. *Biotecnologia Industrial*. Vol. 1. Fundamentos. São Paulo: Blucher; 2001.
83. Mota M, Lima N. *Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa; 2003.

SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

REAÇÕES DE CLIVAGEM ÁCIDA DE AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS LIGADOS A POLÍMEROS: RELEVÂNCIA PARA A METODOLOGIA DE SÍNTESE DE PEPTÍDEO

Eduardo Maffud Cilli
Júlia Pinto Piccoli
José Roberto Ernandes
Clovis Ryuichi Nakaie
Guita Nicolaewsky Jubilut

5.1 INTRODUÇÃO

Os primeiros peptídeos foram sintetizados na década de 1950^{1,2}, e a metodologia empregada naquela época foi denominada “clássica”, ou, mais comumente, *em solução*. Nesse método, as etapas sintéticas são efetuadas em solução homogênea, e ele envolve, geralmente, etapas de purificação de cada intermediário obtido, o que significa laboriosos processos de extrações,

cristalizações e caracterizações. Dessa forma, a síntese de pequenos fragmentos peptídicos é muito demorada. Apesar dessa limitação, esse método ainda é utilizado na obtenção de peptídeos comerciais, pois a partir do estabelecimento da rota sintética mais eficiente, essa técnica permite a obtenção de grande quantidade de material.

Apesar dessa vantagem, a dificuldade relacionada à morosidade do método não permitiu atender à enorme demanda de síntese de novas sequências peptídicas, resultado da explosiva procura por moléculas com novas atividades biológicas. O método da síntese de peptídeos denominado em *fase sólida* (SPFS, ou, em inglês, solid phase peptide synthesis – SPPS) surgiu, portanto, nesse contexto histórico. Introduzido por Bruce R. Merrifield na década de 1960³, esse novo protocolo permitiu a obtenção de diferentes peptídeos em intervalos de tempo relativamente curtos (Figura 5.1).

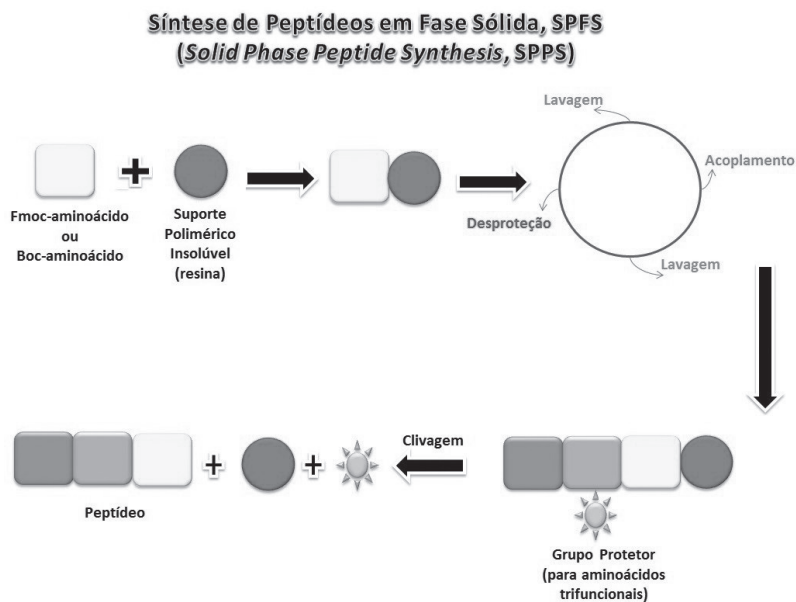


Figura 5.1 Esquema resumido da síntese de peptídeos em fase sólida.

Esse método de síntese está descrito em diversas revisões⁴⁻¹³ e baseia-se no crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia peptídica presa covalentemente pelo seu aminoácido carboxiterminal a sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina). A característica insolúvel da resina possibilita

que todas as etapas de síntese sejam realizadas em um único frasco de reação contendo uma placa porosa filtrante. Essa placa retém a resina desde o início até o final da síntese, o que evita a troca do frasco de reação, simplificando o manuseio e impedindo perdas de produto. O uso da resina insolúvel permite que a eliminação de todos os reagentes, solventes e subprodutos, das diversas etapas do ciclo sintético, seja feita por simples filtração em placa porosa. Esse procedimento faz com que o método se torne simples e rápido, além de permitir o uso de grandes excessos de reagentes. Esse procedimento também garante reações mais eficientes e quantitativas em todas as etapas do ciclo sintético. Somado a isto, como as etapas sintéticas atualmente são padronizadas e repetitivas, é possível a automação desse método de síntese peptídica.

Apesar da simplicidade e rapidez do método, a SPFS possui uma perigosa limitação decorrente da não purificação dos produtos intermediários. Se a eficiência de cada ciclo sintético não atingir valores muito próximos do ideal (100%), pode-se ter, ao final da síntese, além do produto desejado, uma mistura muito heterogênea de subprodutos, que, dependendo do caso, dificilmente serão separados do peptídeo desejado. Rendimentos apenas razoáveis ou mesmo sofríveis são ainda observados na prática, principalmente provocados pela agregação das cadeias peptídicas no interior do grão de resina, o que causa o aparecimento de sequências com deleção, ou seja, sequências peptídicas caracterizadas pela falta de um ou mais resíduos de aminoácidos^{14,15}. Diversas técnicas têm sido utilizadas para a identificação e estudos dessas sequências, incluindo a medição direta do grão de resina^{7,16,17} a espectroscopia na região do infravermelho (IV)¹⁸, a *high-resolution magic angle spinning* (HRMAS-NMR)^{19,20}, e a ressonância paramagnética eletrônica (RPE, ou, em inglês, *electron paramagnetic resonance* – EPR)^{21,22}.

Desse modo, para que a síntese em fase sólida possa manter as vantagens de rapidez e praticidade, é fundamental que todas as etapas da síntese e também a clivagem final do peptídeo da resina ocorram com rendimentos próximos do ideal.

De acordo com o que já foi dito anteriormente, o polímero que serve como suporte sólido para o crescimento das cadeias peptídicas é fundamental para o sucesso da SPFS, devendo preencher os seguintes requisitos:

- a) ser insolúvel em todos os solventes utilizados;
- b) apresentar completa estabilidade química e física;
- c) conter sítios ativos onde deve ocorrer a ligação do aminoácido carboxiterminal, através de ligação estável covalente;

- d) possuir estrutura que possibilite a rápida difusão dos reagentes até os sítios de reação e que facilite também a remoção de subprodutos, por meio de lavagens por filtração; e
- e) não introduzir impedimentos estéricos significativos nas reações químicas que ocorrem em seu interior.

Embora existam outras opções na literatura, principalmente resinas que empregam copolímeros contendo grupos polares do tipo acrilamida ou derivados^{13,23-25} e polietilenoglicol (PEG)²⁶, o copolímero mais utilizado na síntese peptídica, desde a implantação do método da fase sólida, tem sido o copolímero de estireno contendo 1%, em peso, de intercrossamentos de divinilbenzeno (Figura 5.2). Esse copolímero possui a forma de grãos, diâmetro seco entre 35 mm e 150 mm, é completamente insolúvel em todos os solventes e é bastante estável nas condições usuais da síntese. O tamanho do grão é normalmente reportado em tamanho da malha (*mesh*), o qual é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula. As resinas normalmente empregadas são as de 100 *mesh* a 200 *mesh* e de 200 *mesh* a 400 *mesh* (75 mm a 150 mm e 35 mm a 75 mm, respectivamente).

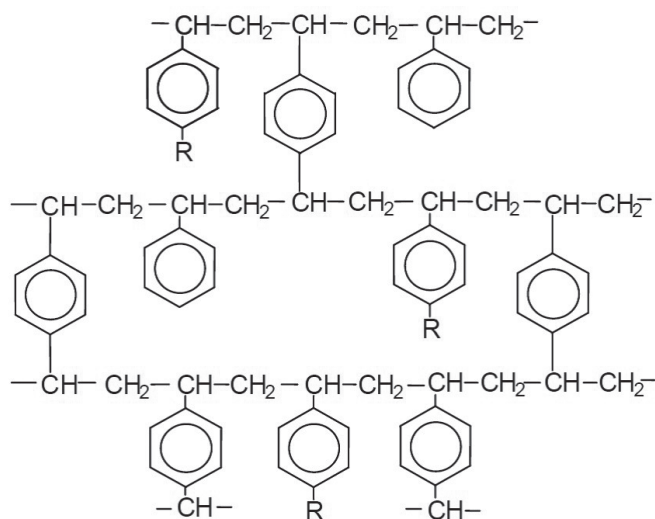


Figura 5.2 Estrutura química do copolímero de estireno, contendo 1% em peso de divinilbenzeno, funcionalizado com grupos R.

A constituição da estrutura química do copolímero de poliestireno, composta predominantemente de anéis benzênicos e grupos metilênicos,

é bastante apolar, possuindo melhor solvatação em solventes apolares (tolueno, diclorometano ou clorofórmio) do que em solventes mais polares (dimetilformamida, álcoois ou água)^{16,27}.

A SPFS nos últimos anos tem apresentado grandes avanços devido à utilização de métodos mais eficientes de acoplamento^{28,29}, uso de alta temperatura, entendimento dos parâmetros que afetam a solvatação do grão de resina e utilização de diferentes grupos para a funcionalização do polímero utilizado, entre outros.

Crítico para a síntese é a escolha de qual grupo deve ser ligado à resina para o acoplamento do primeiro aminoácido da SPFS. Esse grupo é considerado como um grupo protetor bifuncional, que é ligado à molécula desejada por meio de uma ligação lábil e ao polímero por meio de uma ligação mais estável. O número de grupos (*linker*) utilizados é enorme, sendo que é possível a obtenção de moléculas com diferentes grupos funcionais (amina, álcool, amida, ácido carboxílico, cíclicas etc.), o que ocasionou o desenvolvimento da síntese orgânica em fase sólida (SOPF). Apesar da ligação *linker*-molécula desejada ser rompida (clivada) por diferentes métodos (ácido, base, fotolábil etc.), neste capítulo nos dedicaremos ao método mais utilizado na SPFS: a clivagem ácida.

Este capítulo discute a utilização dos grupos proeminentes na funcionalização dos diferentes polímeros, bem como da etapa de clivagem peptídeo/resina e da hidrólise aminoácido/resina.

5.2 CLIVAGEM PEPTÍDEO/RESINA

Após a síntese peptídica, a liberação do peptídeo da resina é fundamental para a obtenção do material desejado. A metodologia mais empregada atualmente na clivagem peptídeo/resina envolve a utilização de uma solução contendo ácido e supressores de reações colaterais. A solução ácida é a responsável pelo rompimento da ligação entre as cadeias peptídicas e o grão de resina, bem como pela desproteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Os supressores de reações colaterais possuem como função o sequestro, por meio de reações químicas, dos protetores que são liberados em solução, evitando a reação com outros grupos da cadeia peptídica. Durante a clivagem ácida, carbocátions são formados, podendo reagir com a espécie nucleofílica. Se a espécie nucleofílica é parte da molécula do produto a ser clivada em seguida, a molécula pode ser recolocada na fase sólida

através de uma ligação não lábil, o que resulta em baixos rendimentos de produto clivado.

O ácido e os supressores utilizados nesta etapa variam de acordo com a metodologia de síntese. As duas estratégias de síntese mais utilizadas na obtenção de peptídeos estão descritas abaixo. A primeira e mais antiga, emprega o grupamento ácido lábil t-butiloxicarbonila (Boc) como protetor do α -amino grupo, e derivados benzílicos (Bzl) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (Boc/Bzl). Alternativamente, a segunda opção utiliza os grupamentos 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) (base lábil) e terc-butílicos (tBu), respectivamente (Fmoc/tBu). Em ambas as metodologias, o aminoácido carboxiterminal é ligado covalentemente à resina através de uma ligação éster para obtenção de peptídeos com carboxilatos livres, ou de uma ligação amida para a obtenção de peptídeos com extremidade α -carboxamida, após a clivagem final em meio ácido. O teor de incorporação dos aminoácidos é usualmente determinado por análise de aminoácidos.

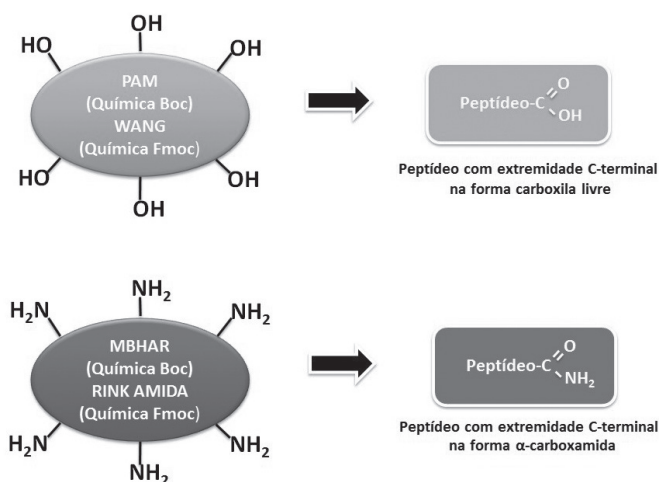


Figura 5.3 Principais resinas utilizadas na síntese de peptídeos em fase sólida para a obtenção de peptídeos carboxila livre e carboxiamidas.

5.3 QUÍMICA BOC/BZL

No caso da estratégia Boc/Bzl, a síntese de peptídeo inicia-se com a remoção do grupo Boc em 30% ácido trifluoracético (TFA) em diclorometano

(DCM), lavagens, desprotonação do amino grupo em 10% N,N,N-trietilamina (TEA) em DCM, lavagens em DCM, seguida da fase de acoplamento do próximo aminoácido (Figura 5.4). A estratégia alternativa Fmoc/tBu é mais simplificada, pois a remoção do grupo protetor Fmoc é feita em meio básico com 20% piperidina em dimetilformamida (DMF), o que já libera o grupo amino na forma desprotonada para a fase seguinte de acoplamento.

Para a clivagem do peptídeo da resina utilizando-se a estratégia contendo o grupo Boc como protetor do grupo amino alfa dos aminoácidos, utilizava-se, prioritariamente o fluoreto de hidrogênio. Devido à dificuldade de obtenção e manuseio desse produto, outros ácidos têm sido utilizados para a clivagem, como a mistura contendo o ácido trifluormetanossulfônico (TFMSA), trifluoracético (TFA) e tioanisol ou o éster de trimetilsililtrifluormetanossulfonato (TMSOTf)³⁰.

A metodologia empregada para a clivagem do peptídeo da resina utilizando a mistura TFMSA/TFA/tioanisol é apresentada no Esquema 1.

5.3.1 Esquema 1: Metodologia para clivagem do peptídeo da resina utilizando TFMSA

Para cada 100 mg de peptidil-resina:

- Adicionar, sob agitação, 200 μ L de tioanisol e 100 μ L de etanoditiol.
- Colocar o frasco em um banho de gelo e espere resfriar.
- Adicionar, sob agitação, 2 mL de ácido trifluoracético.
- Agitar por 2 min.
- Adicionar lentamente, sob agitação, 200 μ L de TFMSA.
- Retirar o frasco do banho de gelo e deixar agitando durante 2 horas a T_{amb} .
- Após este período, adicionar 25 mL de éter etílico.
- Centrifugar e desprezar o sobrenadante. Repetir este procedimento 2 vezes.
- Secar o material obtido (resina + peptídeo).
- Adicionar uma solução contendo água acidulada. Sugestão: 0,045% de ácido trifluoracético em água (dependendo do peptídeo, pode ser necessária a adição de acetonitrila para dissolvê-lo).
- Reservar o sobrenadante (solução contendo o peptídeo). Repetir este procedimento 2 vezes.
- Liofilizar o sobrenadante obtido.

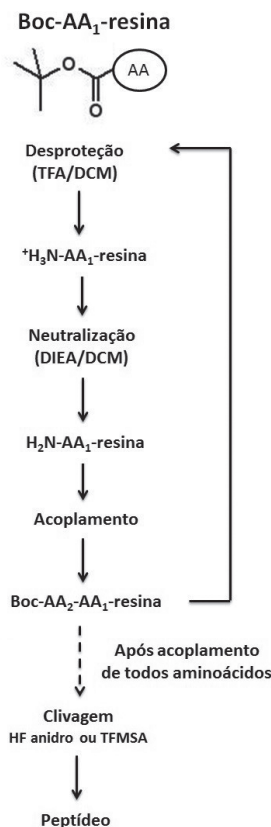


Figura 5.4 Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida utilizando a estratégia Boc.

Os estudos de nosso grupo mostraram que³¹, de maneira geral, a clivagem de um peptídeo contendo na extremidade C-terminal (extremidade do peptídeo ligada à resina) um resíduo hidrofóbico ocorre mais lentamente e com um menor rendimento que peptídeos contendo nessa mesma extremidade um resíduo menos apolar (Figura 5.5). Para melhor entender essa limitação, a angiotensina (DRVYIHPF) contendo o aminoácido fenilalanina (hidrofóbico) em sua extremidade C-terminal e um análogo contendo glicina nesta posição foi sintetizada nas principais resinas utilizadas na SPFS com o protocolo Boc/Bzl (Figura 5.4). As resinas avaliadas foram a resina benzidrilamina (BHAR) e resina metilbenzidrilamina (MBHAR), que, ao final da síntese, produzem peptídeos com a extremidade C-terminal amida; a resina clorometilada (CMR) e a resina 4-(aminoaciloximetil)fenilacetamidometila (PAM), que permitem a obtenção de peptídeos com a extremidade

C-terminal na forma de carboxila livre. A metodologia de clivagem foi a que utiliza a mistura TFMSA/TFA/tioanisol em duas temperaturas diferentes (0 °C e 25 °C).

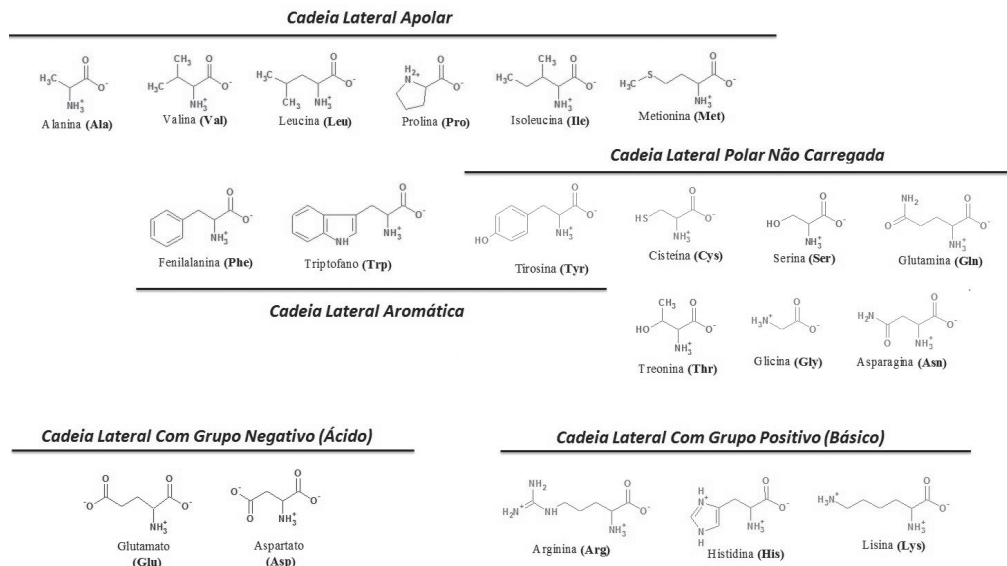


Figura 5.5 Fórmulas estruturais dos aminoácidos classificados de acordo com a natureza da cadeia lateral.

Os resultados mostraram que a ligação peptídeo/suporte sólido nas condições avaliadas para a resina fenilacetamidometila (PAMR), 2 horas de reação a 0 °C, é suficientemente lábil para a remoção de praticamente todo o material, independentemente da polaridade do resíduo de aminoácido ligado a ela (Figura 5.6). No entanto, as resinas BHAR e MBAHR mostraram comportamentos diferentes. A resina BHAR foi adequada para peptídeos contendo resíduo menos apolares na extremidade C-terminal (neste caso representados pela Gly). Para resíduos hidrofóbicos (Phe) essa resina foi inadequada, liberando, mesmo com o aumento de temperatura, apenas 70% das cadeias em duas horas de reação. O uso da resina MBHAR permitiu a liberação de 89% das cadeias peptídicas.

Esses resultados, avaliados isoladamente, mostraram que a resina ideal para a obtenção de peptídeos carboxiamida é a resina MBHAR. No entanto, outro fator deve ser considerado: a liberação das cadeias peptídicas durante a etapa ácida de desproteção do grupo Boc que ocorre durante a síntese.

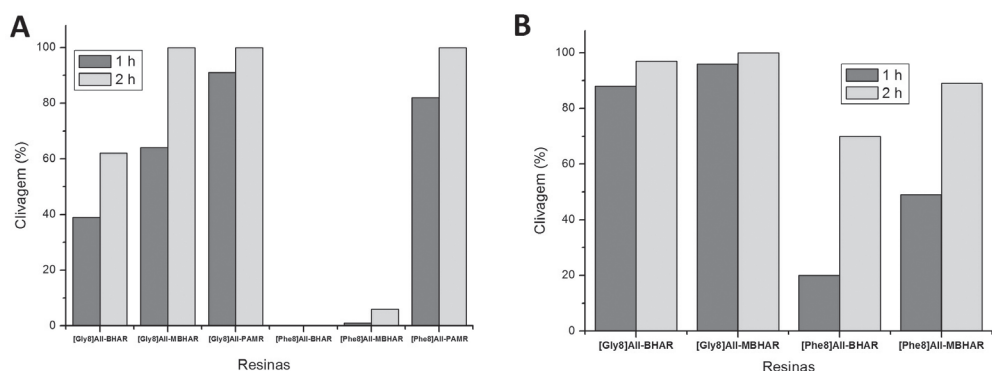


Figura 5.6 Clivagem do peptídeo angio-II ([Phe8]All) e de seu análogo ([Gly8]All) em diferentes resinas por meio do método contendo a mistura TFMSA/TFA/tioanisol a 0 °C (A) e 25 °C (B).

O tratamento com TFA, 30% ou 50% em DCM, deveria apenas remover o grupo Boc da extremidade amínica, mas pode, dependendo da resina, do aminoácido ligado a ela e da frequência desse tratamento, induzir a remoção parcial das cadeias peptídicas, consequência de uma inadequada estabilidade da ligação peptidil-resina^{4,5}. O tratamento ácido para a remoção do grupo Boc deve idealmente clivar completamente o grupo Boc, mas não promover a remoção do peptídeo da resina, o que acarretaria perda das cadeias em crescimento, diminuindo o rendimento final da síntese.

Estudos envolvendo a resina clorometilada (grupo clorometila ligado aos anéis aromáticos do polímero de poliestireno) mostraram que 1% das cadeias peptídicas eram perdidas por etapa de desproteção³². Jubilut e colaboradores³³ mostraram que o tratamento de diferentes peptidil-resinas com TFA 30% em DCM por um período máximo de 20 horas, o que corresponderia a 40 ciclos durante a síntese de um peptídeo composto de 40 resíduos de aminoácidos, promove a perda de uma parcela significativa de cadeias peptídicas da resina. A ordem de estabilidade da ligação peptídeo-resina seguiu a sequência decrescente BHAR > MBHAR = PAMR > CMR.

Somado a isto, foi observado que a ligação da Phe (aminoácido hidrofóbico) à resina foi mais estável do que a da Gly (menos polar). Adicionalmente, esse trabalho mostrou que a substituição de Gly por resíduos de Asp e His não afetou a estabilidade dessa ligação. A perda mais significativa de cadeias peptídicas, observada na Figura 5.7, foi notada com a

[Gly8]-AII-CMR, enquanto a mais estável foi a [Phe8]-AII-BAR (perda de 22% e 5% após 20 horas, respectivamente).

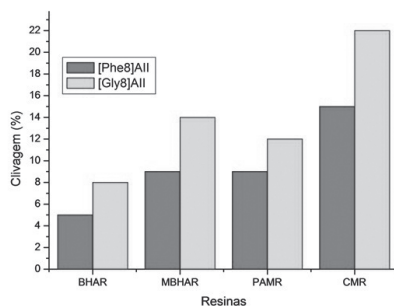


Figura 5.7 Porcentagem de perda de cadeias de angio-II ([Phe8]AII) e de seu análogo ([Gly8]AII), em 40 horas, na presença de 30% TFA/DCM.

De uma forma geral e avaliando os dados detalhados, podemos concluir que, para a obtenção de peptídeos de cadeia longa (por exemplo, com 40 resíduos ou mais) contendo resíduo C-terminal hidrofóbico, a BHAR é mais vantajosa em relação à MBHAR, devido à menor perda nas etapas de desproteção do grupamento Boc. A perda no rendimento em função da estabilidade da ligação peptidil-BHAR na etapa de clivagem é compensada pela maior estabilidade nas repetidas remoções do protetor Boc pelo TFA. No entanto, para peptídeos menores a melhor resina seria a MBHAR.

Como regras gerais para a escolha da melhor resina para a SPFS utilizando a metodologia Boc/Bzl podemos concluir:

- 1) Para peptídeos pequenos (de até 15 resíduos), a utilização da MBHAR é mais vantajosa, independentemente da sequência sintetizada.
- 2) Para peptídeos maiores com um resíduo hidrofóbico na extremidade C-terminal deve-se utilizar a resina MBHAR.
- 3) Para peptídeos maiores com um resíduo polar na extremidade C-terminal deve-se utilizar a resina BHAR.

5.4 QUÍMICA FMOC/TBU

As sínteses que utilizam a estratégia Fmoc/tBu empregam espaçadores mais lábeis para a ligação peptídeo resina (Figura 5.8). Como durante as

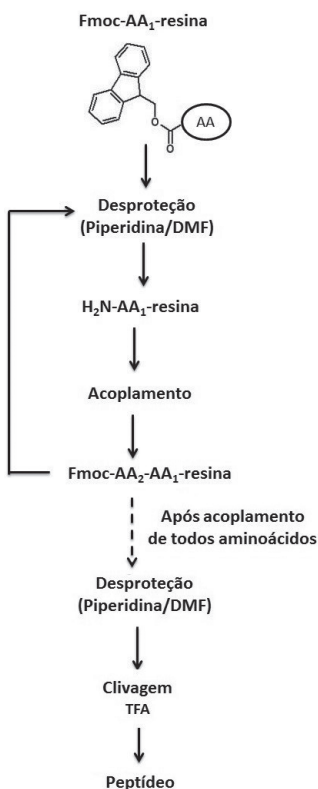


Figura 5.8 Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc.

etapas de acoplamento não se utiliza ácido, o uso desses espaçadores permite que a clivagem do peptídeo da resina ao final da síntese seja realizada em condições menos agressivas. A clivagem é realizada tratando a peptidil-resina com o ácido TFA (trifluoracético) (Esquema 2). Durante o processo, da mesma forma que na química Boc-Bzl, as cadeias laterais também são clivadas. Dessa forma, espécies catiônicas extremamente reativas são geradas a partir dos grupos protetores dos aminoácidos. Esses compostos podem reverter a ligação clivada e modificar resíduos que contenham grupos funcionais nucleofílicos, como: Trp, Met, Tyr, Cys, entre outros (Figura 5.5). Para prevenir, adicionam-se vários reagentes nucleofílicos, que agem como supressores de cadeias laterais, reagindo e inativando os compostos liberados (Figura 5.9).

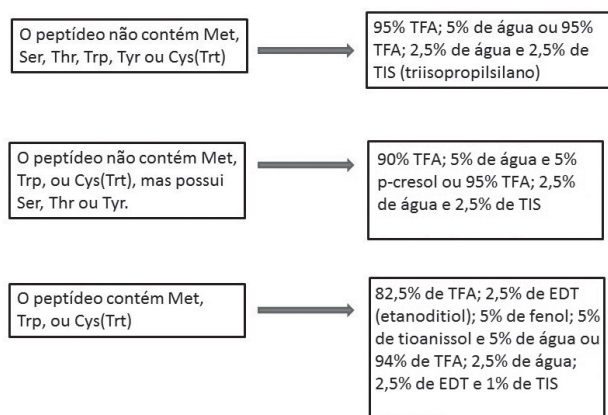


Figura 5.9 Coquetéis utilizados na clivagem de peptídeos da química Fmoc/tBu³⁴.

5.4.1 Esquema 2: Metodologia para clivagem do peptídeo da resina utilizando TFA – Química Fmoc/tBu

Para cada 100 mg de peptidil-resina:

- Adicionar 1 mL da solução descrita na Figura 5.9 de acordo com a composição de aminoácidos do peptídeo. Adicionar, sob agitação, primeiro os supressores de cadeia lateral, e posteriormente o ácido trifluoracético.
- Deixar agitando durante 2 horas ou 4 horas para aminoácidos hidrofílicos ou hidrofóbicos, respectivamente, a T_{amb} .
- Após esse período, adicionar 25 mL de éter etílico.
- Centrifugar e desprezar o sobrenadante. Repetir este procedimento 2 vezes.
- Secar o material obtido (resina + peptídeo).
- Adicionar uma solução contendo água acidulada. Sugestão: 0,045% de ácido trifluoracético em água (dependendo do peptídeo, pode ser necessária a adição de acetonitrila para dissolvê-lo).
- Reservar o sobrenadante (solução contendo o peptídeo). Repetir este procedimento 2 vezes.
- Liofilizar o sobrenadante obtido.

Da mesma maneira que os dados apresentados para as resinas utilizadas na química Boc/Bzl, a natureza do aminoácido ligado à resina também afeta a labilidade da ligação peptídeo/resina nas resinas utilizadas na química Fmoc/tBu. A comprovação foi realizada por Jubilut e cols em 2007³⁵, utilizando novamente os peptídeos [Phe8]AII e seu análogo ([Gly8]AII) em quatro tipos de resinas utilizadas na SPFS empregando a química Fmoc/tBu. As resinas utilizadas neste trabalho foram a que emprega o espaçador ácido 4-hidroximetilfenoxiacético³⁶ (HMPA) ligado ao poliestireno e a resina Wang (polímero funcionalizado com grupos p-alcoxibenzílicos). Ambas as resinas são utilizadas na obtenção de peptídeos com a extremidade C-terminal na forma de carboxilatos. Para as resinas que possibilitam a obtenção de peptídeos carboxiamida foram avaliadas as resinas Rink, que possuem, ligado ao polímero, o grupamento ácido 4-[(2',4'-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil]fenoxiacetamido, e a resina contendo o espaçador Knorr³⁷ (ácido 4-[(*R,S*)- α -[1-(9*H*-fluoren-9-il)-metoxi-formamida]-2,4-dimetoxibenzil-fenoxiacético).

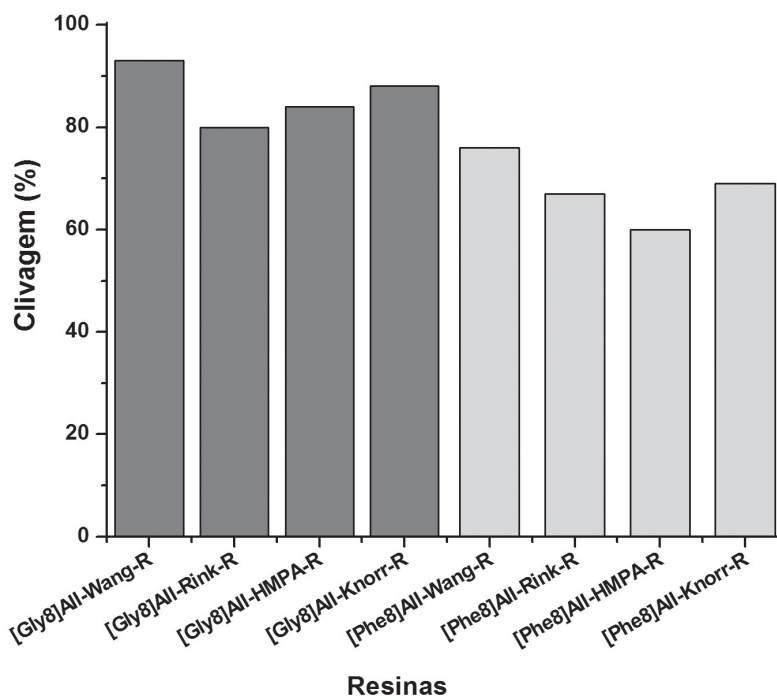


Figura 5.10 Clivagem do peptídeo angio-II ([Phe8] AII) e de seu análogo ([Gly8] AII) em diferentes resinas por meio do método contendo a mistura 82,5% TFA; 2,5% de EDT; 5% de fenol; 5% de tioanisol e 5% de água (Reagente K) a T_{amb} por 2 horas³⁶.

Os dados obtidos mostraram que independentemente da resina utilizada, quando o resíduo de aminoácido ligado à resina é hidrofóbico, há necessidade de maior tempo para a remoção do peptídeo da resina, quando comparado a resíduos menos hidrofóbicos. Os dados obtidos também mostraram que isso ocorre independentemente do “coquetel” (mistura) de clivagem utilizada (Figura 5.10). Aminoácidos hidrofóbicos proporcionam maior estabilidade da ligação e maior dificuldade de clivagem, necessitando de um maior tempo para a clivagem.

Os dados obtidos sugerem que, para cadeias contendo como primeiro aminoácido da síntese um resíduo hidrofóbico, o tempo de reação deve ser aumentado em relação ao normalmente utilizado, isto é, de duas horas para quatro horas de reação.

Esses resultados mostraram também que o rendimento da SPFS é altamente dependente da etapa final da síntese: a clivagem do peptídeo da resina.

5.5 HIDRÓLISES DE PEPTÍDEOS

Outro item merecedor de atenção, que também está relacionado ao rompimento da ligação peptídeo/resina, é a etapa que envolve a hidrólise de aminoacil- e peptidil-resinas juntamente com as demais ligações peptídicas. A importância de se obter a hidrólise completa do grupamento ligado à resina e posterior análise de aminoácidos, possui importância quantitativa na síntese de peptídeos e na caracterização de biomateriais.

Para um estudo mais aprofundado da hidrólise ácida da ligação peptídeo/resina avaliamos novamente o tipo de peptídeo e a procedência da resina. Somado a isto, o teor de sítios ativos na resina em função da hidrólise da ligação aminoácido/resina também foi estudado.

Desde a introdução do protocolo utilizando a solução ácida contendo HCl 12 mol.L⁻¹/ácido propiônico (1:1, v/v) a 130 °C por duas horas para aminoacil ou peptidil-resinas^{38,39}, nenhum estudo sistemático foi realizado sobre a aplicabilidade desse procedimento a outras resinas introduzidas posteriormente. Além disso, o papel exato de outros fatores que afetam a reação de hidrólise, tais como a natureza do aminoácido carboxiterminal e o teor de sítios ativos, ainda não tinha sido investigado.

Na literatura, há artigos que descrevem a necessidade de tempos maiores do que duas horas para a hidrólise de algumas peptidil-resinas⁴⁰, enquanto outros sugerem que o aumento de temperatura para 160 °C durante quinze

minutos é suficiente para a hidrólise total⁴¹. Outros artigos sugerem ainda o emprego de micro-ondas para acelerar e otimizar o processo.

A hidrólise de aminoacil-resinas (Gly, Val e Phe) ligadas a BHAR de diferentes graus de substituição (0,47; 0,8 e 2,2 mmol/g) ocorreu com HCl:Prop a 130 °C. Independentemente do tempo de hidrólise, o teor de sítios por grão das resinas de partida (grau de substituição) não afetou a porcentagem de hidrólise. A Tabela 5.1^{35,42} mostra, no entanto, que há uma nítida influência do aminoácido carboxiterminal na velocidade de sua hidrólise. O aminoácido glicina, o menos apolar entre os estudados, mostrou a necessidade de 30 horas de reação para que a sua ligação com a resina fosse rompida. Esse tempo aumentou para 70 e 100 horas para os aminoácidos mais hidrofóbicos Val e Phe, respectivamente.

Tabela 5.1 Porcentagem de hidrólise de aminoacil-BAR de diferentes graus de substituição em HCl:Prop, 130 °C em diferentes tempos

| AMINOACIL-BAR /GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (mmol/g) | TEMPO DE HIDRÓLISE (h) | | | | | |
|---|---------------------------|----|-----|----|-----|-----|
| | 2 | 15 | 30 | 50 | 70 | 100 |
| Gly (0,47) | 18 | 80 | 100 | – | – | – |
| Gly (0,80) | 17 | 81 | 100 | – | – | – |
| Gly (2,20) | 18 | 79 | 100 | – | – | – |
| Val (0,47) | 11 | 36 | 54 | 73 | 100 | – |
| Val (0,80) | 10 | 35 | 53 | 72 | 100 | – |
| Val (2,20) | 11 | 36 | 54 | 73 | 100 | – |
| Phe (0,47) | 7 | 24 | 38 | 58 | 71 | 100 |
| Phe (0,80) | 7 | 24 | 38 | 57 | 72 | 100 |
| Phe (2,20) | 7 | 24 | 37 | 58 | 71 | 100 |

Devido à constatação da necessidade de tempos prolongados para a hidrólise completa dos aminoácidos ou peptídeos das resinas utilizadas na estratégia Boc, testou-se alternativamente um protocolo que pudesse ser mais rápido e eficiente do que o clássico: HCl 12 mol.L⁻¹/ácido propiônico (1:1, v/v) a 130 °C por duas horas.

Como na literatura já existiam trabalhos envolvendo análise de peptídeos e proteínas, nos quais se substituía o ácido propiônico pelo TFA com

melhores resultados^{43,44}, aplicamos essa opção para o caso de hidrólise de aminoácil e peptidil-resinas. Essa maior eficiência foi atribuída à capacidade de melhor solvatação do copolímero pelo TFA em comparação com o ácido propiônico. Para avaliar a utilização em detalhes do TFA, o primeiro parâmetro estudado foi a melhor proporção entre esse ácido e o ácido clorídrico.

Visto que o objetivo dessa substituição foi o de obtermos condições de hidrólise mais rápida possível, a temperatura escolhida foi 160 °C. Nesses estudos utilizamos a aminoácil-resina Phe-BAR com 0,4 mmol/g de grau de substituição como modelo. Os resultados mostraram que as hidrólises mais rápidas foram alcançadas quando se empregou a proporção 3:1 (v/v) entre HCl 12 mol.L⁻¹ e TFA (Tabela 5.2). Esse resultado indicou que quando se emprega um ácido mais forte que o propiônico, mas com igual ou melhor capacidade solvatante da resina, obtemos hidrólises mais eficientes, independentemente do aminoácido a ela ligado³⁵. A utilização da mistura 3:1 (v/v) entre HCl 12 mol.L⁻¹ e TFA permitiu que o tempo para hidrólise total da ligação Phe-resina diminuísse para 15 horas para as resinas PAM e MBHAR e para 30 horas para a resina BHAR.

Para uma avaliação mais completa dos métodos de hidrólises existentes, a degradação de cada aminoácido nas condições de hidrólise também foi analisada.

Tabela 5.2 Efeito da proporção entre HCl e TFA (v/v) na velocidade de hidrólise (em porcentagem) de Phe-BAR a 160 °C

| TEMPO (h) | PROPORÇÕES DE HCL/TFA (V:V) | | | |
|-----------|-----------------------------|-----|-----|-----|
| | 1:2 | 1:3 | 1:4 | 1:9 |
| 5 | 56 | 64 | 59 | 36 |
| 20 | 90 | 100 | 92 | 59 |

Como o TFA a 160 °C poderia afetar a estabilidade dos aminoácidos, a degradação destes sob essa nova condição de hidrólise foi testada e comparada com a metodologia que utiliza HCl/ácido propiônico (Tabela 5.3). Os dados mostraram que a utilização do TFA aumenta a degradação dos aminoácidos de uma maneira geral. Os aminoácidos Asp, Pro, Gly, Ala, Val, Leu e Phe não são degradados, enquanto Ser, Thr e Cys são degradados totalmente.

Tabela 5.3 Porcentagem de degradação de aminoácidos pelo método do HCl:TFA (3:1) e HCl/Prop (1:1) a 160 °C após 15 horas de reação

| AMINOÁCIDO | MÉTODO | |
|------------|---------------|----------------|
| | HCl/TFA (3:1) | HCl/Prop (1:1) |
| Asp | 0 | 0 |
| Thr | 100 | 100 |
| Ser | 100 | 100 |
| Glu | 18 | 6 |
| Pro | 0 | 0 |
| Gly | 0 | 1 |
| Ala | 0 | 0 |
| Cys | 100 | 100 |
| Val | 0 | 3 |
| Met | 54 | 36 |
| Ile | 21 | 18 |
| Leu | 6 | 0 |
| Tyr | 51 | 20 |
| Phe | 2 | 0 |
| His | 16 | 5 |
| Lys | 9 | 4 |
| Arg | 8 | 0 |

Neste capítulo foram investigados os fatores que afetam a labilidade da ligação aminoacil ou peptidil-resina e a implicação desses resultados para a metodologia da síntese peptídica em fase sólida. Esta labilidade foi testada frente a diferentes condições ácidas, visando tanto a clivagem do peptídeo da resina como a hidrólise total da ligação, juntamente com a hidrólise do peptídeo.

Em todos os estudos foi possível verificar a importância da natureza do aminoácido na estabilidade da ligação com a resina. Aminoácidos mais hidrofóbicos aumentam a estabilidade da ligação, dificultando seu rompimento.

Os resultados indicam que os tempos de clivagem recomendados por anos na literatura não são suficientes para a remoção quantitativa de peptídeos contendo resíduos hidrofóbicos em sua extremidade C-terminal, fato este que pode afetar de maneira significativa o rendimento final da SPPS.

Os estudos das resinas mais comumente utilizadas na SPFS mostraram que ocorre diferença na labilidade da ligação com o peptídeo dependendo do grupo utilizado na funcionalização do copolímero.

Outro dado interessante foi que a mistura HCl:TFA, na proporção 1:3, v/v, induz hidrólise mais rápida que o tradicional HCl:ácido propiônico, 1:1, v/v, utilizado normalmente nos protocolos tradicionais. No entanto, a degradação de alguns aminoácidos aumenta com a utilização do TFA.

Os dados obtidos mostraram que a padronização dos métodos de clivagem e hidrólise devem levar em conta a natureza do aminoácido ligado à resina. Somado a isto, outros grupos para a funcionalização dos polímeros devem ser estudados, visando aumentar o rendimento da etapa final da síntese, a clivagem.

REFERÊNCIAS

1. Du Vigneaud V. Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. *Harvey Lect.* 1954;50:1-26.
2. Schwyzzer R, Sieber P. Total Synthesis of Adrenocorticotrophic Hormone. *Nature.* 1963;199:172-4.
3. Merrifield RB. Solid-phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry.* 1964;3:1385-90.
4. Barany G, Merrifield RB. Kinetics and Mechanism of the Thiolytic Removal of the Dithiasuccinoyl (Dts) Amino Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* 1980;102(9):3084-5.
5. Stewart JM, Young JD. Solid phase peptide synthesis. Rockford: Pierce Chemical Company; 1984 Junho; 2: Cap 32.
6. Kent SB. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:957-89.
7. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.* 1990;35(3):161-214.
8. Kates SA, Albericio F, editors. Solid Phase Synthesis, A Practical Guide. New York: Marcel Dekker; 2000; 1.
9. Seneci P. Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies. New York: John Wiley & Sons; 2000.
10. Goodman M, Felix A, Moroder L, Tomiolo C. Synthesis of Peptides and Peptidomimetics. In: Büchel, KH, editor. *Houben-Weyl-Methoden der organischen Chemie*, vol. E22. Stuttgart: Thieme; 2002.
11. Benoiton NL. Chemistry of Peptide Synthesis. Boca Raton: CRC Press; 2005.
12. Howl J. Peptide Synthesis and Applications (Methods in Molecular Biology). Totowa: Humana Press; 2005.
13. Atherton E, Sheppard RC. Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (The Practical Approach Series). Published by Oxford University Press, USA; 1989.
14. Remuzgo C, Andrade GF, Temperini ML, Miranda MT. Acanthoscurrin fragment 101-132: total synthesis at 60 degrees C of a novel difficult sequence. *Biopolymers.* 2009;92(1):65-75.
15. Schnolzer M, Alewood P, Jones A, Alewood D, Kent SBH. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics.* 2007;13(1-2):31-44.
16. Cilli EM, Oliveira E, Marchetto R, Nakaie CR. Correlation between Solvation of Peptide-Resins and Solvent Properties(1). *J Org Chem.* 1996;61(25):8992-9000.
17. Cilli EM, Marchetto R, Schreier S, Nakaie CR. Correlation between the Mobility of Spin-Labeled Peptide Chains and Resin Solvation: An Approach To Optimize the Synthesis of Aggregating Sequences. *J Org Chem.* 1999;64(25):9118-23.

18. Cespedes GF, Vicente EF, Cilli EM. Uso da FTIR na obtenção de resinas e na síntese de peptídeos em fase sólida. *Química Nova*. 2011;34(4):589-94.
19. Keifer PA. Influence of Resin Structure, Tether Length, and Solvent upon the High-Resolution (1)H NMR Spectra of Solid-Phase-Synthesis Resins. *J Org Chem*. 1996;61(5):1558-69.
20. Valente AP, Almeida FC, Nakaie CR, Schreier S, Crusca E, Cilli EM. Study of the effect of the peptide loading and solvent system in SPPS by HRMAS-NMR. *J Pept Sci*. 2005;11(9):556-63.
21. Ribeiro SCF, Schreier S, Nakaie CR, Cilli EM. Effect of temperature on peptide side chain aggregation: an EPR study of model peptidyl-resins. *Tetrahedron Letters*. 2001;42:3243-6.
22. Cilli EM, Vicente EF, Crusca Jr E, Nakaie CR. EPR investigation of influence of side chain protecting groups on peptide-resin solvation of the Asx and Glx model. *Tetrahedron Letters*. 2007 Jul;48(31):5521-4.
23. Atherton E, Clive DL, Sheppard RC. Letter: Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J Am Chem Soc*. 1975;97(22):6584-5.
24. Auzanneau FI, Meldal M, Bock K. Synthesis, characterization and biocompatibility of PEGA resins. *J Pept Sci*. 1995;1(1):31-44.
25. Medal MP. PEGA: A flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1992;33(21):3077-80.
26. Bayer E. Towards the Chemical Synthesis of Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*. 1991 Feb;30(2):113-216.
27. Wieland BA, Mefferd RB. Identification of periodic components in physiological measurements. *Psychophysiology*. 1969;6(2):160-5.
28. Carpino LA. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc*. 1993;115(10):4397-8.
29. El-Faham A, Subirós Funosas R, Prohens R, Albericio F. COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chemistry*. 2009;15(37):9404-16.
30. Yajima H, Kiso Y. Studies on peptides. XLIV. Synthesis of the basic trypsin inhibitor from bovine pancreas (Kunitz and Northrop) by the fragment condensation procedure on polymer support. *Chem Pharm Bull*. 1974;22(5):1087.
31. Nakaie CR, Miranda AD, Miranda MTM, Oliveira ED, Marchetto R, Malavolta L, et al. Acid cleavage reactions of amino acids and peptides bound to polymers: relevance for peptide synthesis methodology. In: Nantes IL, Brochsztain S, editors. *Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media*. Kerala: Research Signpost; 2007. p. 141-160.
32. Mitchell AR, Erickson BW, Ryabtsev MN, Hodges RS, Merrifield RB. Tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin,

a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J Am Chem Soc.* 1976;98(23):7357-62.

33. Jubilut GN, Cilli EM, Tominaga M, Miranda A, Okada Y, Nakaie CR. Evaluation of the trifluoromethanesulfonic acid/trifluoroacetic acid/thioanisole cleavage procedure for application in solid-phase peptide synthesis. *Chem Pharm Bull.* 2001;49(9):1089-92.

34. Pennington MW, Byrnes ME. Procedures to improve difficult couplings. In: Pennington MW, Dunn BM, editors. *Peptide synthesis protocols*. Humana Press: Totowa; 1994. (Methods in Molecular Biology; v. 35). p. 1-16.

35. Jubilut GN, Cilli EM, Crusca E, Silva EH, Okada Y, Nakaie CR. Comparative investigation of the cleavage step in the synthesis of model peptide resins: implications for na-9-fluorenylmethyloxycarbonyl-solid phase peptide synthesis. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2007;55(3):468-70.

36. King DS, Fields CG, Fields GB. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res.* 1990;36(3):255-66.

37. Bernatowicz MS, Daniels SB, Koster HA. Comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides. *Tetrahedron Letters.* 1989; 30(35):4645-8.

38. Scotchler J, Lozier R, Robinson AB. Cleavage of single amino acid residues from Merrifield resin with hydrogen chloride and hydrogen fluoride. *J Org Chem.* 1970;35(9):3151-2.

39. Westall FC, Scotchler J, Robinson AB. The use of propionic acid-hydrochloric acid hydrolysis in Merrifield solid-phase peptide synthesis. *J Org Chem.* 1972;37(21):3363-5.

40. Matsueda GR, Stewart JM. A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides.* 1981;2(1):45-50.

41. Westall F, Hesser H. Fifteen-minute acid hydrolysis of peptides. *Anal Biochem.* 1974;61(2):610-3.

42. Jubilut GN, Marchetto R, Cilli EM, Oliveira Ed, Miranda Ad, Tominaga M, et al. Comparative Time Course Study Of Aminoacyl-And Dipeptidyl-Resin Hydrolysis. *Journal of Brazilian Chemical Society.* 1997;8(1):65-70.

43. Tsugita A, Uchida T, Mewes HW, Ataka T. A rapid vapor-phase acid (hydrochloric acid and trifluoroacetic acid) hydrolysis of peptide and protein. *J Biochem.* 1987;102(6):1593-7.

44. Tsugita A, Scheffler JJ. A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. *Eur J Biochem.* 1982;124(3):585-8.

6

CAPÍTULO

PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS: APRIMORAMENTO DA SÍNTESE EM POLÍMEROS ATRAVÉS DO USO DA RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

Clovis Ryuichi Nakaie
Luciana Malavolta
Shirley Schreier
Eduardo Maffud Cilli
Reinaldo Marchetto

6.1 INTRODUÇÃO

No mundo contemporâneo, a síntese química de *peptídeos* tem obtido cada vez mais importância devido à contínua descoberta de inúmeras atividades dessas macromoléculas tanto no organismo animal quanto vegetal. Embora existam outras metodologias que levem à produção desse tipo de macromolécula, e que mencionaremos adiante, a mais empregada por

laboratórios de pesquisa e indústrias farmacêuticas e de produtos químicos em geral, movimentando um mercado de centenas de bilhões de dólares anualmente, lança mão da síntese, via polímeros. Nesse procedimento, a sequência peptídica desejada é sintetizada quimicamente ancorada em uma matriz polimérica, através da sua extremidade carboxiterminal. Essa metodologia é denominada de *síntese de peptídeos em fase sólida* (SPFS) e tem sido alvo de um contínuo processo de aprimoramento desde a sua introdução, há cerca de três décadas (por Bruce R. Merrifield, que recebeu o prêmio Nobel de Química em 1984 pela proposição dessa técnica)¹. Diferentes aspectos desse método sintético têm sido investigados, objetivando seu aprimoramento como um todo. Dentre essas tentativas, uma que nosso grupo de trabalho tem enfatizado, e de modo praticamente exclusivo, envolve o emprego da ressonância paramagnética eletrônica (RPE), conjuntamente com a estratégia de avaliação do grau de inchamento de grãos de peptidil-resinas. O objetivo tem sido o de entender cada vez melhor os complexos detalhes físico-químicos do processo de solvatação de cadeias peptídicas quando espalhadas no interior dos grãos de peptidil-resinas. Tem-se testado algumas dezenas de sistemas de solventes em uma ampla variedade de peptidil-resinas, utilizadas como solutos-modelo, objetivando, ao final, esclarecer os complexos fatores que governam a dinâmica do crescimento de cadeias peptídicas dentro da malha polimérica. Esses testes auxiliarão a proposição de alterações experimentais para o aprimoramento dessa metodologia química.

Para tanto, fez-se necessário o desenvolvimento prévio de um composto orgânico com característica especial denominado comumente de marcador de *spin* (ou *spin label*) e que contém em sua estrutura um grupamento do tipo radical livre, estável nas condições normais de pH e temperatura. O elétron desemparelhado presente nesse grupamento radicalar lhe dá a propriedade paramagnética a qual permite que esse marcador absorva radiações de baixa frequência (cerca de 10^{-12} Hertz – região das micro-ondas), emitido adequadamente pelo espectrômetro de RPE. Com isso, obtêm-se espectros que fornecem informações em termos da dinâmica e ordenamento molecular dentro de um sistema no qual se encontra ligado esse marcador ou sonda paramagnético. Esse composto, abreviadamente denominado TOAC (ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico), que foi derivado apropriadamente para poder ser utilizado na química de peptídeos e outras macromoléculas, funciona como uma espécie de molécula repórter do sistema em estudo quanto à solvatação de peptidil-resinas, sendo portanto bastante valioso para uma possível otimização da metodologia da SPFS. Em tópicos subsequentes, iremos detalhar melhor alguns dos termos que

mencionamos até o momento nesta etapa introdutória, dentre os quais o de peptídeos, SPFS, os pré-requisitos necessários para determinados polímeros servirem de suporte sólido para a SPFS, a técnica da RPE, o marcador de *spin* e a versatilidade da RPE para demonstrar possível correlação que possa existir entre o grau de solvatação de cadeias peptídicas no interior da matriz polimérica e o rendimento de uma síntese peptídica. Espera-se, portanto, apresentar um conjunto de investigações já efetuadas e expostas até o momento na literatura mundial e que têm trazido, acreditamos, principalmente via emprego alternativo da RPE, significativos avanços em termos de conhecimentos mais aprofundados de fatores que afetam o sucesso ou não da síntese de um peptídeo, via SPFS. Espera-se, com isto, demonstrar a relevância desses estudos na biotecnologia moderna com clara aplicação, principalmente na área da saúde e mesmo no amplo campo da química de polímeros em geral.

6.1.1 Peptídeos

Sucintamente, define-se *peptídeo* ou *peptídio* como um composto orgânico formado por dois ou mais aminoácidos (até um máximo de cerca de 40 unidades), acoplados entre si por um tipo especial de ligação química denominada peptídica^{2,3}. Macromoléculas contendo mais do que esse número de resíduos de aminoácidos já passam a ser usualmente denominadas proteínas. A especificidade estrutural e conformacional da denominada *ligação peptídica* (ver as representações de sua estrutura e de um pentapeptídeo na Figura 6.1) está relacionada com as seguintes características: i) a sua formação exige a eliminação de uma molécula de água e é feita entre os α -amino e α -carboxigrupos presentes nas estruturas de dois aminoácidos adjacentes, respectivamente; ii) em termos de ressonância eletrônica, essa ligação possui característica única que é intermediária entre a de uma ligação simples e a de uma dupla; iii) os quatro átomos que a formam (C, H, N e O) se posicionam em uma conformação planar rígida, onde a rotação somente é possível no C $^{\alpha}$; iv) celularmente, as etapas de sua formação e hidrólise requerem uma maquinaria bastante complexa, muito diferente da que ocorre em reações químicas efetuadas em solução *in vitro*.

Os aminoácidos que compõem a estrutura de um peptídeo possuem, assim, esses grupamentos em seus C $^{\alpha}$ e também cadeias laterais próprias que os diferencia entre si. Essas unidades estruturais podem, portanto, ser neutras, hidrofílicas ou hidrofóbicas, e, com exceção da glicina, são todas

enantiômeras da forma L em termos de configuração estrutural. As moléculas de peptídeos encontradas em animais e vegetais podem apresentar algumas alterações estruturais, como a amidação de sua extremidade C^α-carboxílica, acetilação da amínica, fosforilação ou sulfatação de um ou mais aminoácidos hidroxilados (serina, treonina ou tirosina) etc. Algumas podem assumir uma estruturação cíclica, via formação de pontes de dissulfeto com dois resíduos de cisteína. Excepcionalmente, não apresentam aminogrupos livres em sua extremidade, encontrando-se nessa posição terminal resíduos não naturais, como é o caso do resíduo de ácido piroglutâmico.

Por conter resíduos de aminoácidos de diferentes tipos e em diferentes

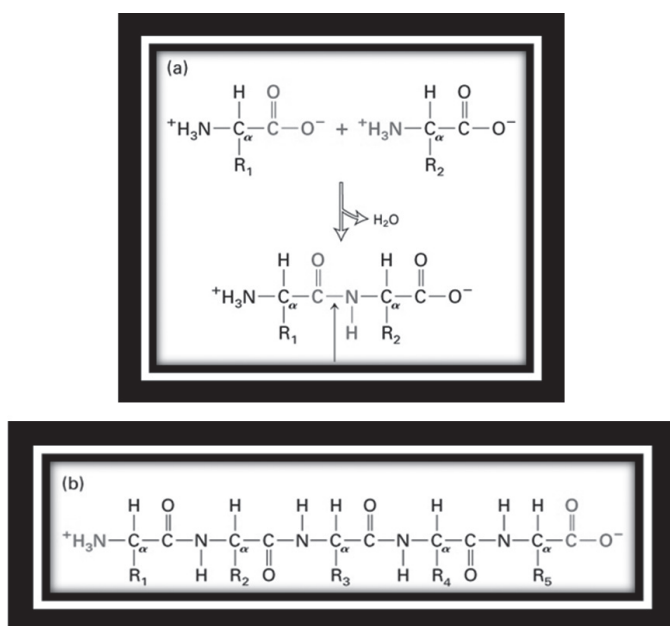


Figura 6.1 Representação da formação de uma ligação peptídica e estrutura de um pentapeptídeo.

seqüências, cada peptídeo possui, portanto, uma característica única. Em sua estrutura podem existir, a depender do pH do meio, sítios carregados eletricamente, devido, por exemplo, a grupamentos amínicos protonados ou carboxílicos negativos das extremidades de sua seqüência, mas também das cadeias laterais de aminoácidos básicos ou ácidos, respectivamente.

Conjuntamente, esses resíduos que compõem um determinado segmento peptídico podem lhe dar características próprias como as apresentadas na

Tabela 6.1. Nota-se nos exemplos expostos nesse caso que o efeito do pH é extremamente relevante, induzindo alta solubilidade em pH ácido no denominado peptídeo β -amiloide (42 aminoácidos), que parece formar agregados fibrilares (placas) neuronais, induzindo a doença de Alzheimer^{4,5}. Por outro lado, nota-se no fragmento TM-32, que corresponde à porção 66 a 97 do receptor B2 do peptídeo hipotensor bradicinina^{6,7}, uma forte solubilização em pH alcalino. Finalizando, um simples octapeptídeo, conhecido pela sua pouca solubilidade⁸, se mostrou completamente insolúvel, independentemente do pH do meio. Esses dados foram obtidos como complemento de parte de trabalho já publicado, cujo objetivo era a investigação de fatores que afetam ou não as propriedades físicas de diferentes tipos de sequências peptídicas em solução^{9,10}.

Tabela 6.1 Solubilidade dos peptídeos β -amiloide (1-42)*, TM-32** e VVLGAIV-amida em função do pH do meio

| PEPTÍDEOS | SOLUBILIDADE (%) | | |
|--------------------------|------------------|----------|----------|
| | pH = 3,0 | pH = 7,4 | pH = 9,0 |
| β -amiloide (1-42) | 86 | 6 | 0 |
| TM-32 | 0 | 11 | 65 |
| VVLGAIV-amida | 0 | 0 | 0 |

^a Solubilidade: solução de 10 mg/mL de peptídeo em solução aquosa.

* DAEFRHDSGYDVHHQKLFFAEDVGSQKGAIIGLMVGGVVIA-COOH.

** VAEIYLGNLGAKLILASGLPFWAITIANNFD-amida.

Os peptídeos possuem enorme importância tanto na vida animal quanto vegetal, e acredita-se que praticamente todos são produtos provenientes de hidrólises de diferentes tipos de proteínas, efetuadas usualmente por enzimas proteolíticas. No animal, as funções dessas macromoléculas estão voltadas principalmente para o funcionamento celular e fisiológico do organismo, com atividades hormonais, analgésicas, antibactericidas, de neurotransmissão etc. Nos vegetais, essas funções estão mais voltadas para a defesa (toxinas) e também aos processos de sinalização celular.

O contínuo interesse em se estudar peptídeos na vida moderna e com enormes gastos se deve primeiramente à necessidade do suprimento de alguns tipos de peptídeos no organismo, cuja ausência ou diminuição na concentração fisiológica pode levar a conhecidas doenças, como a diabetes

do tipo *mellitus* (falta de insulina) e do tipo *insipidus* (falta de vasopressina), a doenças que envolvem a tireoide (tireoliberina ou TRH), a alterações na coloração de pele (hormônio estimulador de melanócito, α -MSH) e no crescimento (hormônio liberador do hormônio do crescimento, GHRH), a doenças neurodegenerativas (mal de Alzheimer, Parkinson) etc. A Tabela 6.2 lista exemplos de alguns peptídeos denominados bioativos, o número de resíduos de aminoácidos que os compõem e a sua atuação no organismo animal.

Tabela 6.2 Alguns exemplos de peptídeos biologicamente ativos

| PEPTÍDEOS | PROCESSOS BIOLÓGICOS/DOENÇAS |
|---|------------------------------|
| 1. Tireoliberina TRH (n = 3 aa) | Doença da tireoide |
| 2. Angiotensina II (n = 8 aa) | Hipertensão arterial |
| 3. Bradicinina (n = 9 aa) | Hipertensão, inflamação |
| 4. Ocitocina (n = 9 aa) | Parto e aleitamento |
| 5. Vasopressina (n = 9 aa) | Diabetes <i>insipidus</i> |
| 6. α -MSH (n = 13 aa, N ^α -acetilado) | Coloração da pele |
| 7. Gastrina (n = 17 aa) | Secreção gástrica |
| 8. Leptina (n = 49 aa) | Obesidade |
| 9. GHRF (n = 44 aa) | Crescimento |
| 10. Insulina (n = 51 aa) | Diabetes <i>mellitus</i> |
| 11. β -amiloide (n = 42 aa) | Doença de Alzheimer |
| 12. Amilina IAPP (n = 37 aa) | Diabetes tipo II |

Além desse objetivo, o principal foco no estudo de peptídeos reside, na realidade, na procura por potenciais derivados que possam funcionar como novas drogas terapêuticas, inibindo ou ativando diferentes processos biológicos no organismo. Para se atingir esse objetivo, no entanto, faz-se necessário o estudo do mecanismo de ação de tais processos *in vivo*, tornando, portanto, indispensável não somente a síntese do peptídeo natural, mas também a de vários derivados que poderão facilitar a elucidação da atividade natural desses peptídeos. Nas últimas décadas, diversos mecanismos de funcionamento de peptídeos, principalmente no organismo humano, têm sido esclarecidos com a introdução no mercado farmacêutico de novos

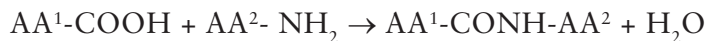
medicamentos do tipo derivados peptídicos. De qualquer forma, a maioria dos processos de mau funcionamento ou de doenças em geral em que há a participação de peptídeos continua à espera de uma elucidação completa do mecanismo de ação no organismo de cada peptídeo e, por conseguinte, à espera da proposição de novas drogas de efeito terapêutico. Explica-se, desse modo, o grande investimento financeiro observado há décadas no campo farmacêutico e também em laboratórios de pesquisa espalhados pelo mundo, salientando-se o imprescindível domínio da tecnologia de obtenção de peptídeos de modo rápido, prático e com grande eficiência.

Nesse aspecto, existem na atualidade procedimentos de síntese peptídica alternativa, como o que emprega DNA recombinante¹¹, com o uso de protocolos clássicos no campo da biologia molecular (expressão gênica, clonagem, mutação etc.); a que lança mão de bactérias como “produtoras” de peptídeos, sendo mais empregada na produção de peptídeos de sequências mais longas e de difícil obtenção química. Uma das limitações desse método reside no fato de que somente se podem produzir sequências peptídicas naturais, isto é, sem alterações estruturais induzidas pela introdução, por exemplo, de compostos orgânicos não naturais na estrutura peptídica em estudo. Similarmente a esse método, existe outro que se vale de enzimas específicas promotoras da formação de ligação peptídica entre dois resíduos de aminoácidos em condições experimentais específicas^{12,13}. Embora também promissora, existem ainda restrições a essa técnica, pois não há uma regra clara de que enzima se necessita para cada tipo de acoplamento entre diferentes aminoácidos. Desse modo, o que se observa atualmente é o emprego maciço da técnica já mencionada SPFS e, em parte, também via metodologia da síntese em *solução* ou *clássica* por praticamente todos os centros de pesquisa e empresas de produção de peptídeos.

6.1.2 Síntese química de peptídeos

6.1.2.1 Método da síntese de peptídeos em solução ou clássico

O primeiro método químico testado para a produção de peptídeos foi o chamado método em *solução ou clássico*¹⁴. Nesse procedimento, dois resíduos de aminoácidos são acoplados por uma ligação peptídica entre os seus α -amino e carboxilgrupos, conforme esquema a seguir:



Nesse método, lança-se mão de um ativador químico (agente acoplante) que faz a ligação peptídica destacada acima com concomitante liberação de uma molécula de água. Embora ainda em uso, principalmente para peptídeos específicos para escalas maiores, essa técnica tem ficado mais restrita ao campo industrial, pois é bem mais trabalhosa e lenta, necessitando, por exemplo, inicialmente, de uma proteção temporária do amino grupo do AA^1 e da carboxila do AA^2 por algum grupamento químico, a fim de se evitar reações de acoplamento entre os mesmos aminoácidos. Além disso, caso envolva sequências peptídicas que contêm aminoácidos, por exemplo, com cadeias reativas como a lisina (possui grupamento amínico no C^d) ou ácido aspártico (possui grupo carboxílico no C^b), estas deverão conter também grupos protetores temporários que somente serão eliminados ao final da síntese.

Também é relevante o fato de que, como a reação é feita em solução, há sempre a necessidade de, após o término da formação da ligação peptídica, perder-se um enorme tempo nos processos de purificação dessa solução, que ainda contém todos esses componentes e mais parte dos aminoácidos que não reagiram. Para tanto, torna-se necessário o emprego de protocolos clássicos de extração, precipitação, cristalização etc., para finalmente se ter em mão o dipeptídeo puro, mas ainda contendo os mencionados grupamentos protetores. O passo seguinte deverá envolver a retirada do protetor do grupo carboxílico do AA^2 , a fim de livrá-lo para posterior reação com o próximo aminoácido. Nota-se, portanto, que é um protocolo experimental de síntese peptídica bastante complexo e demorado, não atendendo, assim, às necessidades mais recentes de obtenção de uma grande quantidade de sequências peptídicas diferenciadas em um curto espaço de tempo, principalmente para a pesquisa laboratorial. Procurando contornar essa séria limitação, principalmente no aspecto da necessidade de maior rapidez na produção de peptídeos, o professor Robert Bruce Merrifield, da Rockefeller University, propôs a metodologia sintética alternativa já mencionada¹, baseada no emprego de materiais poliméricos como suporte sólido para o alongamento químico de um segmento peptídico (*síntese de peptídeos em fase sólida* – SPFS).

6.1.2.2 Método da síntese peptídica em fase sólida (SPFS)

O raciocínio básico da metodologia da SPFS envolve a ligação do aminoácido C-terminal à matriz polimérica, e todos os demais aminoácidos da sequência peptídica desejada são acoplados sucessivamente, por estratégias apropriadas, sem a necessidade de purificar-se cada fragmento peptídico intermediário. Apenas ao final da síntese cliva-se o peptídeo do suporte sólido e, após isso, parte-se para uma etapa laboriosa de separação dos subprodutos formados, além do peptídeo desejado. A insolubilidade da resina utilizada (detalhes no tópico seguinte) faz com que todas as reações químicas necessárias para o crescimento da cadeia peptídica possam ser efetuadas, do início ao final da síntese, em um único frasco de reação contendo uma placa porosa para a retenção dos grãos insolúveis da peptidil-resina. Dessa forma, o excesso dos reagentes e outros produtos formados nas diversas etapas dos ciclos sintéticos são eliminados por simples filtração.

Apesar de ser vantajoso no sentido de rapidez e praticidade e permitir também a automatização de toda a síntese, o fator negativo do processo reside em não se efetuar nenhuma etapa de purificação dos fragmentos intermediários, como acontece com a síntese em solução. Fica, portanto, evidente que a utilização do método da SPFS, embora extremamente rápida e prática, depende fundamentalmente de obterem-se rendimentos perto da idealidade (100%) em cada etapa do ciclo sintético. Devido a esse pré-requisito básico, tem-se observado na literatura um contínuo e progressivo aprimoramento dessa metodologia, mesmo após quase cinco décadas desde a sua introdução, refletido nas inúmeras publicações especializadas referentes a essa metodologia¹⁵⁻¹⁸.

A Figura 6.2 mostra uma representação esquemática do processo de crescimento da cadeia peptídica ancorada pela sua extremidade carboxílica em um suporte polimérico (fase sólida). Em complemento, a Figura 6.3 detalha melhor essa metodologia, revelando os ciclos sintéticos dos dois métodos existentes atualmente de SPFS, cuja diferença básica reside no fato de que o protetor temporário do α -amino grupo dos aminoácidos é removido ou em meio ácido (grupo terc-butiloxicarbonila/Boc)^{15,16} ou em meio básico (grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonila – Fmoc)^{17,18}. No caso da estratégia Boc, o ciclo sintético inicia-se com a remoção do grupo Boc do aminoácido N-terminal, utilizando-se uma solução de 30% ácido trifluoracético (TFA)/diclorometano (DCM) (30 minutos), seguido da desprotonação do grupamento amínico, realizada com 10% trietilamina (TEA)/DCM (10 minutos), e, finalmente, a etapa crítica do acoplamento do aminoácido subsequente.

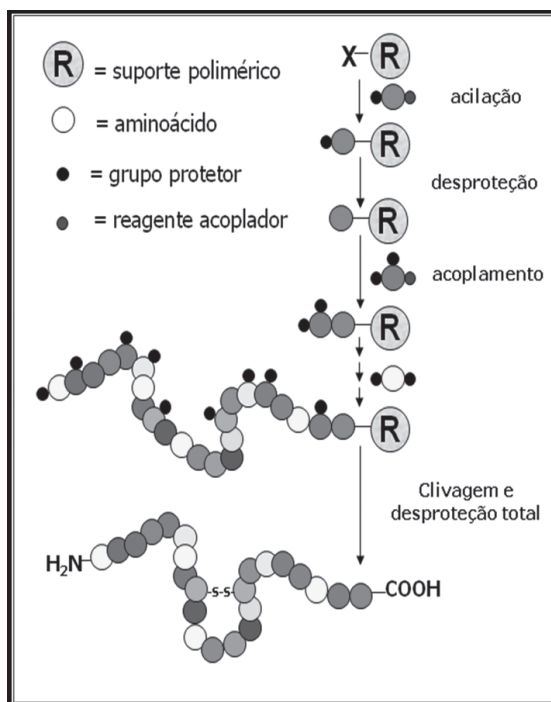


Figura 6.2 Esquema de uma síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).

No caso da remoção do grupo protetor Fmoc, essa etapa já é realizada em meio básico orgânico (20% piperidina em dimetilformamida – DMF –, 20 minutos), liberando o amino grupo desprotegido em sua forma já desprotonada (básica) para a fase seguinte de acoplamento. Além dessa diferença, os tipos de grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos empregados nessas duas estratégias de síntese também se diferenciam e são geralmente do tipo benzila e *terc*-butila para as denominadas químicas Boc e Fmoc, respectivamente.

Comum às duas estratégias químicas é a etapa da reação de acoplamento dos aminoácidos, a qual é usualmente realizada com a mistura dos agentes acilantes diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt)¹⁶. Se necessário, utiliza-se uma mistura dos ativadores 0-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato e 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HATU/HOAt)¹⁹. O excesso molar empregado dos Boc e Fmoc-aminoácidos e dos agentes acilantes fica em torno de três vezes em relação à quantidade de aminogrupos presentes na resina. O acoplamento de cada resíduo

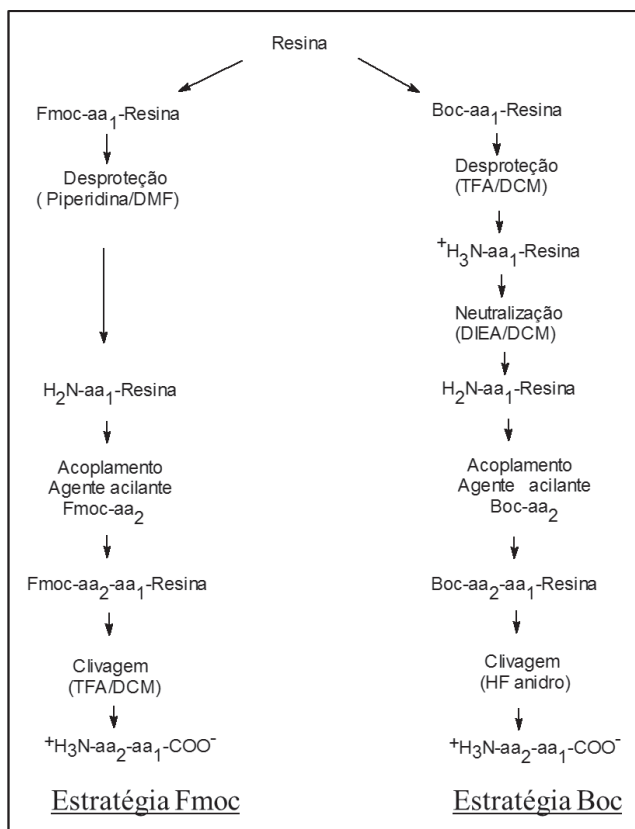


Figura 6.3 Esquema de estratégias opcionais (Fmoc e Boc) de síntese em fase sólida.

de aminoácido é monitorado pelo método qualitativo de ninidrina²⁰, que detecta colorimetricamente a presença de aminogrupos livres que ainda não reagiram (coloração púrpura). Caso se obtenha um teste positivo (coloração azul ou marrom apenas no caso da prolina), repete-se o acoplamento do aminoácido, e, em muitos casos, alterando-se, por exemplo, os sistemas de solventes (mudança no efeito de solvatação dos grãos), tipos de agentes acilantes, temperatura da reação etc. Após o encerramento dessa etapa, reinicia-se o próximo ciclo até o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos da sequência peptídica desejada.

No caso da estratégia Boc de síntese, a clivagem final do peptídeo da resina e a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais é geralmente feita em uma única etapa de tratamento por uma ou duas horas, a 0 °C com HF anidro, em presença de o-cresol e anisol (5% cada, v/v), os quais agem

como supressores de reações colaterais induzidas por carbocátions liberados durante esse tratamento com ácido forte, por cerca de duas horas, a 0 °C^{15,16}. Alternativamente, existe o método da clivagem com o ácido trifluorometanosulfônico (TFMSA), que, em proporção entre 10% e 20% (v/v) com TFA, contendo também supressores de reações colaterais como o-cresol e o etanoditiol, pode servir para remoção das cadeias peptídicas do suporte sólido²¹.

No caso da química Fmoc, normalmente se adiciona um espaçador químico específico entre o suporte sólido e o aminoácido C-terminal, tornando mais lábil a remoção do peptídeo da resina. Com isso, pode-se fazer a clivagem em meio ácido mais fraco do que o HF anidro da química Boc, sendo o mais comumente empregado uma mistura do ácido trifluoroacético (TFA) em DCM (cerca de 80% a 90% do ácido)¹⁸ e mais alguns dos supressores de reações colaterais mencionados na clivagem em HF ou TFMSA. Após essa etapa de remoção das cadeias peptídicas, a resina é lavada com éter etílico para remoção de subprodutos provenientes dessa clivagem, sendo o peptídeo bruto extraído com solução aquosa ácida (5% ácido acético ou 80% a 90% TFA, para a química Boc e Fmoc, respectivamente). No primeiro caso, após essa lavagem, o extrato ácido é finalmente liofilizado para obter-se o peptídeo bruto em forma de pó branco, amorfo. No caso da química Fmoc, o extrato de TFA contendo o peptídeo é extraído com éter etílico, e a solução ácida é evaporada e novamente dissolvida em meio ácido mais fraco (ácido acético ou mesmo TFA) para posterior liofilização.

Por fim, há a necessidade da escolha prévia da resina a ser utilizada, dependendo da química escolhida e também se o terminal carboxílico deve ficar em forma de carboxamida ou carboxílico. No caso da estratégia Boc, existem resinas como a metilbenzidrilamino-resina (MBAR) e a (benzidrilamino-resina) BAR que, após clivagem, fornecem peptídeos-amida, enquanto resinas denominadas clorometiladas ou PAM-resinas²², por formarem ligação éster com o peptídeo, liberam-no em forma de carboxilato. Na química Fmoc, existem grupos químicos específicos (espaçadores) que são acoplados inicialmente em sítios reativos de resinas e que, ao sofrer clivagem, liberam o peptídeo em forma de carboxamida ou carboxilato.

Embora quase meio século tenha se passado desde a introdução dessa técnica revolucionária, restam ainda problemas em diferentes pontos do ciclo sintético que não foram totalmente contornados até o momento^{15,17,23,24}. Assim, sucintamente, podemos destacar a clivagem apenas parcial tanto dos grupos protetores das cadeias laterais reativas dos aminoácidos, mas principalmente das cadeias peptídicas ancoradas ao suporte sólido, durante a clivagem final ácida do peptídeo da resina. Esse problema foi particularmente

um dos pontos investigados por nosso grupo, pois pode significar a perda de significativa parcela das cadeias peptídicas sintetizadas, tendo sido possível até o momento, a proposição de regras mais claras entre o peptídeo a ser sintetizado e a resina correspondente a ser utilizada, tanto na química Boc-clivagem em HF anidro²⁵ ou TFMSA²⁶. De modo similar, esse problema da estabilidade da ligação peptidil-resina foi também investigada na química Fmoc²⁷. Uma revisão de todos esses esforços, todos voltados especificamente para esse tópico totalmente negligenciado no estudo da SPFS, foi também publicado²⁸.

Na química Fmoc, esse volumoso e hidrofóbico protetor amínico apresenta, em algumas situações, dificuldades na etapa de remoção efetuada em meio básico (20% piperidina/DMF), característica esta dependente da tendência agregante ou não da sequência peptídica em crescimento dentro do grão de resina²⁹. Além das dificuldades relatadas acima, tem sido reportada também na literatura a ocorrência das denominadas sequências “difíceis”^{15,30-32} devido a problemas conformacionais da sequência desejada, agravada possivelmente por algum tipo de interação da cadeia peptídica com a matriz da resina. De modo geral, essas sequências possuem forte tendência agregante e que induz impedimentos espaciais na extremidade amino-terminal do peptídeo, dificultando ou mesmo inviabilizando o acoplamento eficiente do aminoácido seguinte da sequência desejada. Em complemento, a síntese efetuada em condições de elevado conteúdo peptídico (CP) na resina – aquela que se inicia com resinas contendo grande quantidade de sítios reativos – continua sendo um outro protocolo sintético considerado “problemático” e até, em muitos casos, “proibitivo”, pois maximiza muito as agregações peptídicas dentro do grão, dificultando ou mesmo impedindo o sucesso das reações de acoplamento³³. Um modo alternativo de, pelo menos parcialmente, contornar esse tipo de limitação foi proposto recentemente³⁴, pois existe enorme vantagem em se produzir no mesmo tempo uma quantidade maior (cerca de dez vezes) de peptídeos por essa estratégia com o emprego de resinas de alto grau de substituição.

Foi basicamente com o objetivo de se contornar essa limitação prática da SPFS que deliberadamente se iniciou o estudo de sínteses peptídicas em alto conteúdo na resina. E, para isso, um melhor entendimento das propriedades de solvatação dos grãos de peptidil-resinas certamente seria fundamental para a proposição de alternativas experimentais vantajosas. Desse modo, foram iniciados estudos que em uma primeira etapa partiram para a investigação da síntese e propriedades de resinas empregadas na síntese peptídica, mas deliberadamente com alto grau de substituição³⁵, seguidos de

estudos que avaliaram as regras que podem estar controlando o processo de *solvatação* durante o crescimento peptídico nessas resinas. Essa investigação foi desenvolvida tanto por medidas de microscopia de grãos de resina quanto pela RPE^{36,37} de peptidil-resinas contendo o marcador paramagnético TOAC já mencionado. Desse modo, antes de entrarmos no tópico que comprova a importância crucial do grau de solvatação de peptidil-resinas na SPFS e os principais esforços feitos até o momento, o denominado *suporte sólido* (polímero) utilizado na SPFS será melhor detalhado a seguir.

○ suporte sólido: características e a natureza de sua função

Em relação à SPFS, admite-se que o suporte sólido não possui apenas a função de apoio para o crescimento peptídico, mas parece afetar, de modo direto ou não, o rendimento final dependendo da natureza de sua estrutura química, da sequência peptídica a ser obtida, das suas características solvantes durante as diversas reações químicas de um ciclo sintético etc. De um modo mais amplo, considera-se ideal que a matriz desse polímero preencha os seguintes requisitos:

- a) conter sítios ativos onde deve ocorrer a ligação do aminoácido carboxiterminal, através de ligação estável covalente;
- b) possuir estrutura que possibilite a rápida difusão dos reagentes até os sítios de reação e que facilite também a remoção de subprodutos, através de lavagens por filtração;
- c) não introduzir impedimentos espaciais significativos nas reações químicas que ocorrem em seu interior;
- d) não apresentar nenhum outro sítio reativo que possa induzir reações ou interações indesejadas;
- e) ser insolúvel em todos os solventes utilizados; e
- f) apresentar completa estabilidade química e física.

Desde a introdução da síntese peptídica, a resina mais empregada tem sido a que contém o copolímero de estireno com 1%, em peso, de inter-cruzamentos de divinilbenzeno, derivado com diferentes grupos funcionais (R), como mostra a Figura 6.4. A estrutura química representada, constituída predominantemente por anéis benzênicos, é de natureza hidrofóbica, obtendo-se solvatação e, portanto, inchamento mais favorecido dos grãos da

resina em solventes do tipo tolueno, diclorometano ou clorofórmio do que em solventes mais polares como álcoois ou água.

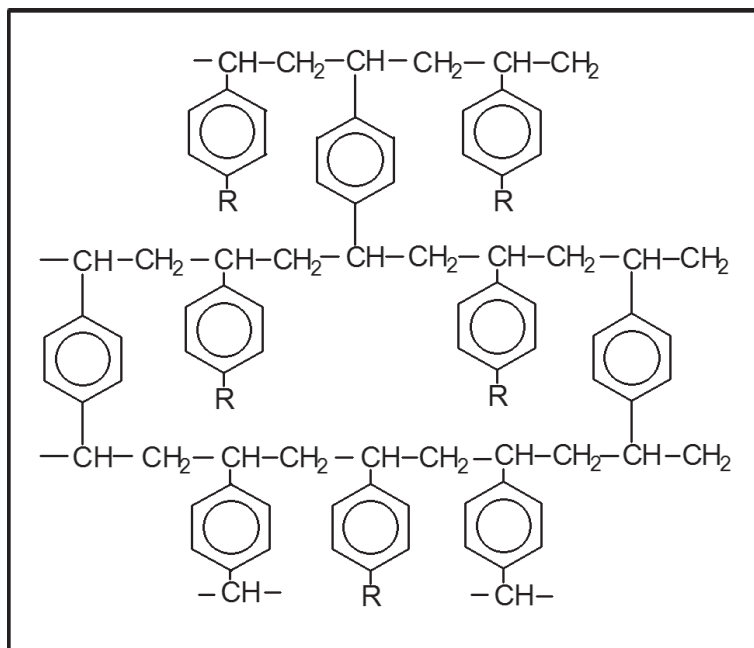


Figura 6.4 Estrutura química do copolímero de estireno, contendo 1%, em peso, de divinilbenzeno.

Com base nessa característica desse tipo de matriz polimérica, admite-se, portanto, que todos os processos de difusão, acoplamento de aminoácidos, desproteções e neutralizações do grupamento amínico, lavagens de reagentes e subprodutos, deverão estar otimizados com o uso de solventes orgânicos apolares.

Esse perfil característico de inchamento de resinas do tipo poliestireno pode ser, no entanto, profundamente alterado, dependendo da natureza e da quantidade do sítio reativo R da resina (Figura 6.4) e também da estrutura química que venha a se ligar a esse grupamento. Por exemplo, no caso da síntese peptídica, a natureza hidrofóbica da matriz de poliestireno pode ser alterada pela inserção progressiva de cadeias peptídicas que, através da presença de seus grupamentos C=O e N-H, de caráter polar, podem afetar significativamente a característica original da matriz polimérica. Nesse aspecto, já se observou que, quanto maior o teor de cadeias peptídicas presas ao grão

da resina, melhor o seu inchamento em solventes mais polares, mas do tipo aprótico como o DMF³⁸, N-Metil-2-pirrolidona (NMP)¹⁸, dimetilsulfóxido (DMSO)³⁹. O aumento do nível de polaridade desta estrutura hidrofóbica tem sido também conseguido através da introdução de quantidades controladas de polietilenoglicol (PEG), de diferentes massas moleculares⁴⁰. Alternativamente, a presença de grandes quantidades de grupamentos ionizados em R (carga positiva ou negativa) pode também afetar drasticamente a propriedade de solvatação da resina.

Devido a essas considerações, os estudos foram iniciados com a síntese da benzidrilamino-resina (BAR)⁴¹ ou metilbenzidrilamino-resina (MBAR)⁴² para a obtenção de peptídeos α -carboxamidas terminais pela técnica da SPFS. O esquema de síntese dessa resina se encontra detalhado na Figura 6.5. Ao se forçar principalmente as condições de síntese da primeira etapa

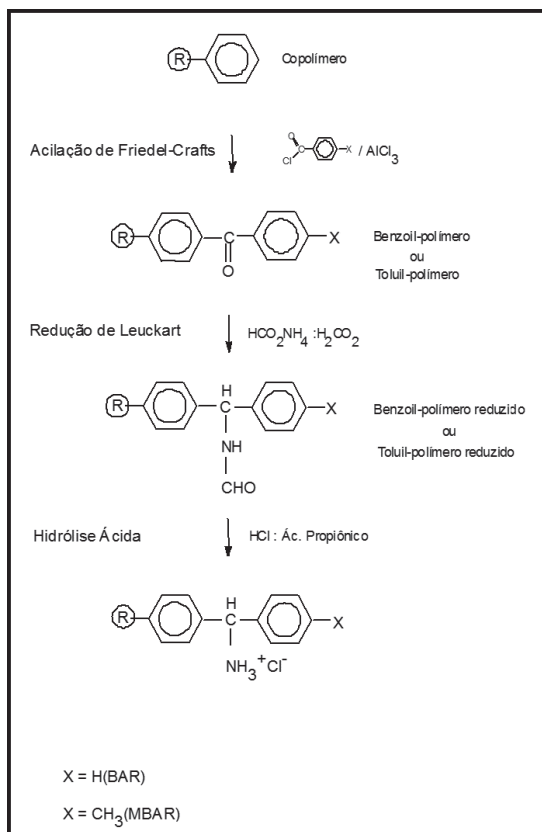


Figura 6.5 Esquema de síntese da BAR e MBAR.

(acilação), conseguiu-se obter lotes com teores de grupamentos fenilmetilamínicos acima de 2 mmol/g³⁵, valores que são bem mais elevados que os existentes comercialmente, que ficam na faixa de 0,4 mmol/g. Além disso, essas investigações permitiram encontrar detalhes experimentais que facilitam a obtenção controlada de resinas com grau de substituição amínica desejada, com pequena margem de variação. A autonomia na obtenção desse polímero já foi estendida para o caso da MBAR.

Existem na realidade outros tipos de copolímeros diferentes do hidrofóbico estireno-divinilbenzeno. Esses materiais possuem estruturas poliméricas com características mais polares e são mais frequentemente empregados na química Fmoc. Usualmente encontram-se grupos acrilamidas que dão esse caráter mais polar a essa classe de copolímeros, e em que se produzem também sítios amínicos para o início da síntese peptídica. Alternativamente, existem protocolos que ligam certos grupamentos químicos, chamados espaçadores, e que, ligados nesses sítios amínicos, permitem o acoplamento do primeiro aminoácido da sequência peptídica pela química Fmoc. Nesse caso, resinas como a MBAR servem perfeitamente para a ligação desses espaçadores.

6.2 IMPORTÂNCIA DA SOLVATAÇÃO DO SUPORTE SÓLIDO PARA A SPFS

6.2.1 Estudos da solvatação de peptidil-resinas por microscopia dos grãos

Admite-se que, quanto melhor o nível de solvatação dos grãos de peptidil-resinas, mais otimizados devem estar os processos difusionais de reagentes e solventes dentro da malha polimérica na SPFS. Nesse contexto, objetivando-se um melhor entendimento dessa característica fundamental da SPFS, diversos laboratórios, inclusive o nosso, têm há muitos anos investigado o complexo fenômeno de solvatação de resinas. Como enfatizado no tópico anterior, conseguiu-se autonomia no domínio da síntese da BAR e da MBAR, ambas contendo estrutura de copolímero de estireno e divinilbenzeno. Outras resinas inéditas mais polares ou mesmo derivadas da BAR também vêm sendo sintetizadas e estão atualmente em vias de avaliação. De qualquer modo, a primeira etapa do estudo da solvatação, via medidas de inchamento por microscopia dos grãos de resinas e peptidil-resinas, seguiu o protocolo experimental descrito a seguir.

6.2.1.1 Metodologia da medida do tamanho dos grãos de resinas por microscopia ótica

Os diâmetros dos grãos de resina (secos ou solvatados) foram medidos por microscopia direta^{35,38}, usando-se uma lupa Olympus modelo SZ11 acoplada a um computador contendo o *software* para tratamento de imagem Image-Pro Plus, versão 3.0.01.00, calibrado com escala 1/100 cm. Antes da leitura por microscopia, os lotes das resinas secas são submetidos a uma etapa de peneiramento em diversos tamises de 37 µm a 210 µm, visando obter a menor dispersão de tamanho possível dos grãos. Após esse tratamento, o desvio padrão das medidas dos diâmetros fica na faixa de 5%. Seguindo-se o protocolo experimental anteriormente publicado^{35,43}, entre 150 e 200 grãos são medidos por lote de resina, tanto secos quanto embebidos previamente durante uma noite no solvente apropriado. O estudo de inchamento é realizado com resinas contendo aminogrupos na forma desprotonada (após tratamento prévio com TEA) e lavagens com DCM e secagem. Em termos práticos, as resinas são tratadas em funil de placa porosa, com DCM (6 × 2 min), com TEA 10 % (v/v) em DCM e DCM (6 × 2 min). Utilizaram-se como parâmetros de inchamento o valor do volume do solvente absorvido pelo grão (volume do grão solvatado – volume do grão seco) e este volume de solvente absorvido relacionado com o volume total do grão solvatado, em porcentagem [(volume do solvente absorvido/%volume do grão solvatado) × 100].

A Figura 6.6 exemplifica esse procedimento experimental com os dados obtidos de uma amostra padrão (MBAR) e apresenta os parâmetros de inchamento para melhor esclarecimento. A figura mostra os grãos da resina ainda na forma bruta, antes da purificação por peneiramento em tamises de metais.

Tabela 6.3 Microscopia óptica dos grãos de resina*

| Resina | DCM | | | |
|-----------------|---|---|---|--|
| | Diâmetro grãos secos ^a (µm) | Diâmetro grãos solvatados ^a (µm) | Volume do solvente por grão ^b (10 ⁵ µm ³) | Solvente dentro do grão ^c (%) |
| MBAR 0,8 mmol/g | 45 | 75 | 1,7 | 78 |

^a Médias geométricas; ^b volume grão solvatado – volume grão seco; ^c porcentagem do volume do grão solvatado ocupado pelo solvente.

* Resina bruta antes do peneiramento.

Para enfatizar quão dependente é o grau de inchamento da natureza do tipo de polímero em relação ao do solvente, a Figura 6.7 faz a representação

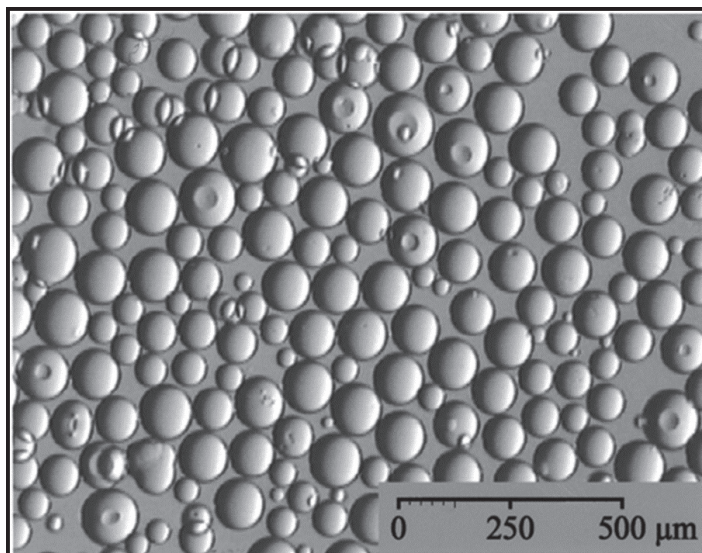


Figura 6.6 Grãos da MBAR (0,8 mmol/g) quando embebidos em DCM e os valores de inchamento obtidos por microscopia.

comparativa do inchamento da BAR de 1,4 mmol/g de grupamentos amínicos e esta mesma resina contendo o hexadecapeptídeo hidrofílico (NANP)₄ ligado à estrutura polimérica⁴⁴. Observa-se nesse caso uma grande diferença de solvatação, com inchamentos mais pronunciados da apolar BAR em DCM e, contrariamente, no polar aprótico DMSO, quando essa resina originalmente apolar contém alternativamente grande quantidade de cadeias peptídicas de natureza polar. O conteúdo peptídico nessa última amostra atinge o valor de cerca de 70% (m/m), isto é, essa peptidil-resina sintetizada a partir de um lote de BAR de alto grau de substituição (1,4 mmol/g) atingiu ao final da síntese uma amostra contendo peptídeo e base polimérica na proporção 7:3 aproximadamente, justificando a enorme alteração do grau de inchamento na fase inicial (BAR sozinha) e contendo o segmento polar (NANP)₄ ligado a sua estrutura.

Como exemplo de expansão desse tipo de estudo de solvatação de polímeros e peptidil-polímeros por microscopia dos grãos, selecionou-se uma série de 22 sistemas de solventes, potencialmente utilizáveis na metodologia da SPFS e que abrange quase totalmente a escala de polaridade conhecida até o momento (Tabela 6.4). O objetivo seria o de verificar melhor a possível correlação entre grau de inchamento de cada peptidil-resina e a polaridade do solvente. Essa tabela destaca os sistemas de solventes utilizados,

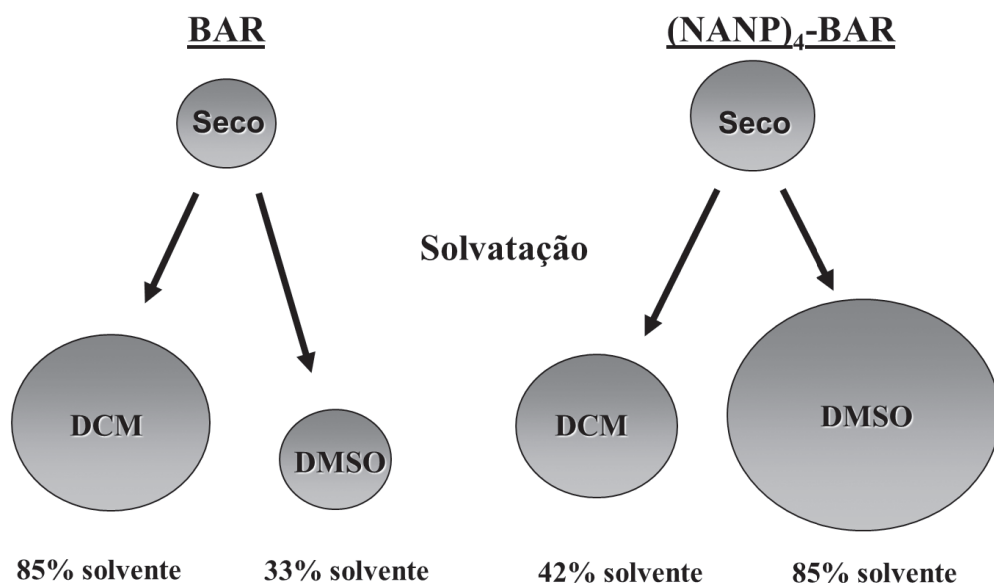


Figura 6.7 Inchamento da BAR (1,4 mmol/g) e da (NANP)₄-BAR (68% de conteúdo peptídico).

com destaque para os valores dos parâmetros de solvente AN e DN⁴⁵, a nova escala de polaridade (AN + DN) que introduzimos anteriormente na literatura^{43,44,46,47} e, por fim, os valores de inchamento das amostras MBAR (0,3 mmol/g) e da VHHQKLFFAEDV-MBAR (grau de substituição de 2,6 mmol/g), em porcentagem⁴⁸.

Os termos AN e DN representam as propriedades eletrofílica (ou receptora eletrônica) e nucleofílica (doadora eletrônica), respectivamente, determinadas anteriormente para dezenas de solventes⁴⁵. O que se descobriu em estudos sequencias é que a soma destes dois termos na proporção 1:1 fornecia um termo representativo adimensional, prático e bastante aceitável relacionado com a polaridade de uma molécula de solvente. Essa escala (AN + DN) se mostrou melhor do que as conhecidas até o momento na literatura, como a constante dielétrica (ϵ), o coeficiente $E_T(30)$ de Dimroth-Reichardt⁴⁹, o parâmetro de Hildebrand d^{50} etc. Ela foi proposta baseada em estudos de várias dezenas de resinas e peptidil-resinas, escolhidas como solutos-modelos e solvatadas em grande quantidade de sistema de solventes de diferentes polaridades. Essa escala varia de zero (tolueno, benzeno) a 129,1 (ácido trifluorometanosulfônico – mais polar)⁴⁴.

Desse modo, a análise da Tabela 6.4 permite detectar significativas diferenças nos graus de inchamento de cada amostra em função do solvente utilizado, o que vem comprovar claramente a dependência entre a polaridade da resina em relação à dos sistemas de solventes.

Tabela 6.4 Grau de inchamento (solvente dentro do grão, em %) de resinas

| | | | | | RESINAS ^A | |
|----|-----------------|------|------|---------|----------------------|----|
| | SOLVENTES | AN | DN | (AN+DN) | 1 | 2 |
| 1 | Tolueno | 3,3 | 0,1 | 3,4 | 87 | 40 |
| 2 | DCM | 20,4 | 1,0 | 21,4 | 84 | 52 |
| 3 | Clorofórmio | 23,1 | 4,0 | 27,1 | 83 | 64 |
| 4 | NMP | 13,3 | 27,3 | 40,6 | 67 | 64 |
| 5 | DMF | 16,0 | 26,6 | 42,6 | 70 | 57 |
| 6 | DMSO | 19,3 | 29,8 | 49,1 | 51 | 65 |
| 7 | TFE | 53,5 | 0,0 | 53,5 | 28 | 60 |
| 8 | EtOH | 37,1 | 32,0 | 69,1 | 19 | 40 |
| 9 | MeOH | 41,3 | 30,0 | 71,3 | 17 | 41 |
| 10 | Formamida | 39,8 | 24,0 | 63,8 | 23 | 46 |
| 11 | 50% TFE/Tolueno | 28,4 | 0,1 | 28,5 | 71 | 64 |
| 12 | 20% TFE/DCM | 27,0 | 0,8 | 27,8 | 72 | 60 |
| 13 | 50% TFE/DCM | 36,9 | 0,5 | 37,4 | 56 | 58 |
| 14 | 80% TFE/DCM | 46,9 | 0,2 | 47,1 | 42 | 65 |
| 15 | 20% DMSO/NMP | 14,5 | 27,8 | 42,3 | 73 | 61 |
| 16 | 50% DMSO/THF | 13,7 | 24,9 | 38,6 | 65 | 55 |
| 17 | 65% NMP/THF | 11,5 | 24,8 | 36,3 | 79 | 66 |
| 18 | 50% DCM/DMF | 18,2 | 13,8 | 32,0 | 70 | 61 |
| 19 | 50% DCM/DMSO | 19,9 | 15,4 | 35,3 | 68 | 65 |
| 20 | 50% MeOH/DMSO | 30,3 | 29,9 | 60,2 | 25 | 56 |

| RESINAS ^A | | | | | |
|----------------------|--------------|------|------|---------|----|
| | SOLVENTES | AN | DN | (AN+DN) | |
| 21 | 50% TFE/DMF | 34,8 | 13,3 | 48,1 | 27 |
| 22 | 50% TFE/DMSO | 36,4 | 14,9 | 51,3 | 28 |

^a [(Volume solvatado – Volume seco) / Volume solvatado] × 100 utilizando os seguintes valores para as medidas dos diâmetros dos grãos secos: Resinas: (1) BHAR, 0,3 mmol/g = 50 mm; (2) VHHQKLVFFAEDV-MBHAR, 2,6 mmol/g = 94 mm.

Legenda: DCM, diclorometano; DMF, dimetilformamida; DMSO, dimetilsulfóxido; EtOH, etanol; MeOH, metanol; NMP, N-Metil-2-pirrolidona; TFE, trifluoretanol; THF, tetrahydrofurano

Visualmente, a Figura 6.8 abaixo destaca esses valores apresentados nesta Tabela 6.4. Observa-se que a MBAR apresenta inchamentos mais favorecidos (região de máximo inchamento) em solventes apolares – valores de (AN + DN) menores, enquanto a peptidil-resina mais polar contendo um fragmento menor do peptídeo β-amiloide⁴ já apresenta deslocamento do pico de máximo de inchamento para solventes com maior polaridade – valores de (AN + DN) ao redor de 40.

Como uma importante observação de caráter físico-químico relacionado com as propriedades de solventes e mesmo de solutos, nota-se na Figura 6.8 que os solventes 21 e 22 (bolas vazias), constantes na Tabela 6.4, se afastaram principalmente da curva da peptidil-resina (painel B), apresentando valores de inchamento menores do que seria de se esperar considerando os valores de polaridade com o termo (AN + DN) desses dois solventes

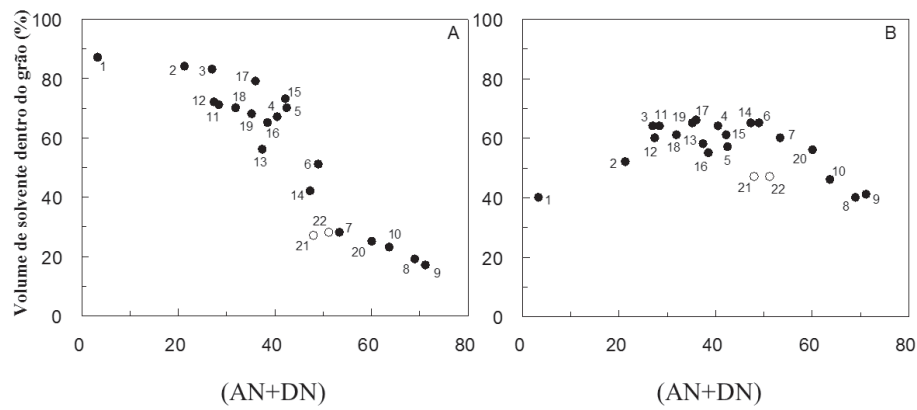


Figura 6.8 Inchamento das resinas BAR, 0,3 mmol/g (A) e VHHQKLVFFAEDV-MBAR, 2,6 mmol/g (B) em função dos valores de polaridade (AN + DN) dos solventes.

mistos (DMF/TFE e DMSO/TFE), respectivamente. Esse efeito observado é de enorme importância no complexo fenômeno da interação soluto-solvente, pois indica que em casos de solventes mistos, não é adequado se produzir os chamados *heterogêneos*, isto é, com propriedades antagônicas em termos de eletrofilicidade e nucleofilicidade. Este é o caso acima, no qual solventes fortemente doadores eletrônicos (valor alto de DN, nucleofílicos como DMF e DMSO) são misturados com o fortemente receptor eletrônico (eletrofílico) como é o caso do TFE (valor de AN alto). Nesse caso, os dois solventes da mistura tendem a se associar entre si em vez de romperem interações de cadeias peptídicas dentro do grão da resina. Desse modo, a força de inchamento dessas duas misturas heterogêneas fica enfraquecida, justificando, portanto, a razão do deslocamento dos pontos de inchamentos dos solventes 21 e 22 da curva geral de solvatação da peptidil-resina acima mencionada. Por outro lado, esse efeito não é muito significativo na MBAR, pois tal resina não contém segmentos peptídicos que poderiam se agregar, forçando os dois solventes da mistura a se associarem como no composto 2 da tabela. Essas conclusões foram tiradas também de estudos de inchamentos de diversas outras peptidil-resinas e foram melhor detalhadas em diferentes trabalhos ^{9,43,44}.

Esse efeito físico-químico envolvendo os conceitos de AN e DN são muito importantes também para o caso da escolha de solventes, objetivando agora a predição da solubilização de determinados peptídeos livres em solução. Certamente as misturas 21 e 22 não serão as melhores para solubilizar sequências fortemente agregadas, e mesmo no caso de envolver a água como um dos componentes da mistura, o mesmo cuidado deve ser considerado para formar as misturas adequadas. A água possui elevado valor de AN, pois é um composto receptor eletrônico forte ou altamente eletrofílico como o TFE⁴⁵, e sua mistura não deve ser feita com solventes antagônicos como, por exemplo, o DMSO, que é um forte doador eletrônico. Ambos se associam fortemente e não conseguem dissolver, como os conhecidos peptídeos insolúveis (amiloidais) envolvidos na formação de placas amiloidais em pacientes com a doença de Alzheimer. Essas observações deixam claro que a escolha de solventes para o uso em determinadas reações ou processos de dissolução de diversos solutos não pode ser aleatória como tem sido feito até agora na literatura, necessitando de uma prévia análise dos componentes da mistura para uma melhor eficiência de uma mistura de solventes. O trabalho de Malavolta et al. (2006)¹⁰ apresenta mais exemplos de aplicação desses conceitos físico-químicos e as implicações reais no complexo item da interação soluto-solvente em geral.

Finalizando este tópico de estudo sobre a importância da solvatação dos grãos de resina no rendimento da SPFS, os dados constantes na Tabela 6.5 mostram, como exemplo, como o grau de inchamento de uma peptidil-resina, no caso contendo um fragmento transmembranar do receptor B2 do peptídeo hipotensor bradiginina^{6,51}, afeta a velocidade da reação de acoplamento. Melhor resultado se observa com o solvente que proporcionou mais inchamento dos grãos (20% DMSO/NMP), se comparado ao clássico DMF, bastante empregado na SPFS. Esses dados corroboram definitivamente que há uma relação direta entre o grau de solvatação e a eficiência de reações químicas dentro do grão de resinas, como descrito previamente^{43,52,53}. Os dados apresentados nessa tabela fizeram parte especificamente de estudos desenvolvidos anteriormente⁴⁶. Essa conclusão é bastante relevante, pois facilita a escolha do melhor solvente para a viabilização da síntese de qualquer sequência, contanto que se possa determinar previamente os graus de solvatação das peptidil-resinas.

Tabela 6.5 Influência do inchamento dos grãos de resina na velocidade da reação de acoplamento de Boc-Leu à PFWAITIANNND-BAR^a

| SOLVENTE | VOLUME DE SOLVENTE DENTRO DO GRÃO ^b (%) | VELOCIDADE DE REAÇÃO DE ACOPLAMENTO (MIN.) | | | |
|----------------|--|--|----|----|----|
| | | 5 | 15 | 45 | 60 |
| DMF | 37 | 29 | 44 | 58 | 71 |
| NMP/DMSO (8:2) | 78 | 40 | 64 | 78 | 86 |

^a BAR de 0,34 mmol/g; ^b (Volume do grão solvatado – Volume do grão seco) / Volume do grão solvatado × 100.

6.2.2 Estudos da solvatação de peptidil-resinas por RPE

Para se estudar as características de solvatação de resinas e peptidil-resinas, via RPE, é preciso partir inicialmente do detalhamento dessa técnica espectroscópica e também do histórico da introdução do marcador de *spin* TOAC, já mencionado, e sua aplicação em peptídeos e peptidil-resinas. Uma explicação sucinta dessa espectroscopia de ressonância irá iniciar este tópico.

6.2.2.1 Método da ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

O método da RPE ou do marcador de *spin* é uma técnica espectroscópica que, conforme já mencionado, se baseia na absorção de radiação eletromagnética na região das micro-ondas ($\sim 10^{-12}$ Hz) e consiste no emprego de uma molécula “sonda” paramagnética (marcador de *spin*) que contém um elétron desemparelhado. O espectro de absorção que é obtido pode fornecer informações de caráter estrutural a respeito do sistema ou local ao qual ela se encontra ligada. Essas informações podem versar sobre o grau de liberdade de movimento na posição onde a molécula “sonda” está ligada, dependendo de fatores como colisões intermoleculares, ordenamento molecular, geometria local e presença de outras espécies paramagnéticas. Essa técnica espectroscópica tem sido objeto de considerável número de livros e artigos de revisão abrangendo sua teoria, metodologia e aplicação em diversos campos de pesquisa^{36,54,55}.

O momento magnético do *spin* (m_s) do elétron desemparelhado da sonda paramagnética, normalmente um radical livre do tipo nitróxido (N-O), pode assumir, em presença de um campo magnético externo, dois níveis energéticos correspondentes à orientação paralela e antiparalela a esse campo magnético (caracterizados por $m_s = +\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$). O fenômeno simples de ressonância envolve a transição do *spin* do elétron do estado de menor para o de maior energia, induzida pela absorção de radiação eletromagnética na região de micro-ondas (Figura 6.9A). Se a frequência (ν) da radiação incidente for mantida constante, a diferença de energia (ΔE) entre os dois níveis permitidos para o *spin* do elétron será proporcional ao campo magnético aplicado (H_0), e é dada por:

$$\text{(Equação 6.1)} \quad \Delta E = h\nu = g_e\beta_e H_0$$

em que h é a constante de Planck, g_e é característica do elétron numa espécie particular e β_e é magneton de Bohr para o elétron.

O espectro de RPE torna-se mais complexo quando ocorre interação entre o *spin* eletrônico e o *spin* nuclear igual a um ($I = 1$) e, portanto, quando esse núcleo é submetido a um campo magnético, o momento magnético de *spin* nuclear (m_I), pode assumir três valores (+1; 0 e -1). Nesse caso, cada um dos níveis eletrônicos será desdobrado em três subníveis (Figura 6.9B), devido ao *spin* nuclear do ^{14}N poder alinhar-se de forma paralela ($m_I = +1$), antiparalela ($m_I = -1$) ou perpendicularmente ($m_I = 0$) ao momento magnético

do elétron. Nesse sistema, as transições permitidas são aquelas nas quais somente o *spin* do elétron varia ($\Delta m_s = 1$), sem alterar o *spin* do núcleo ($\Delta m_l = 0$).

Mantendo-se a frequência (ν) da radiação incidente, as condições de ressonância serão dadas pela Equação 6.1, e essas condições agora estarão satisfeitas em três diferentes valores de campo magnético. Obtêm-se deste modo três picos de absorção, que usualmente são apresentados na forma de primeira derivada. A distância que separa linhas de absorção vizinhas é conhecida como desdobramento hiperfino (a_N), e o fator g determina a posição dessas linhas no campo magnético.

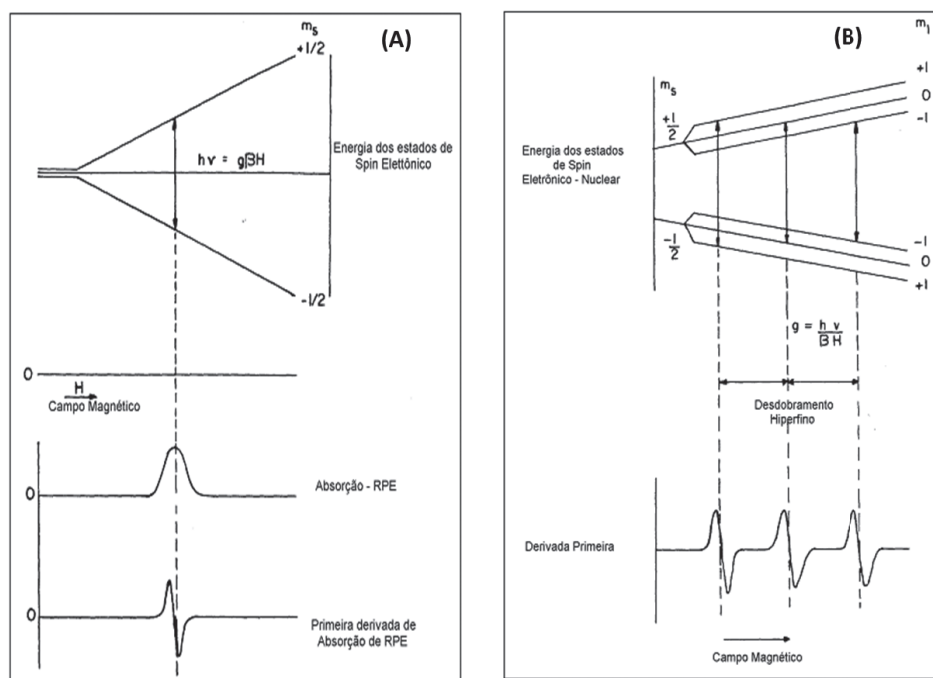


Figura 6.9 (A) Desdobramento dos níveis do *spin* eletrônico em presença de um campo magnético; (B) Desdobramento dos níveis de energia do *spin* eletrônico para um átomo com *spin* nuclear $I = 1$.

Sensibilidade ao movimento molecular

Conforme os valores da velocidade rotacional da molécula obtêm-se diferentes alargamentos das três linhas de absorção nos espectros de RPE

(Figura 6.10), o que é exemplificado com os marcadores de *spin* Tempo e Tempol em diferentes temperaturas. Por exemplo, para graus maiores de imobilização (temperaturas mais baixas), observam-se alargamentos mais acentuados devido à sobreposição de contribuições individuais de diferentes orientações da molécula repórter. A grande utilidade dessa técnica na identificação da conformação de peptídeos ou detalhes dinâmicos do interior de uma matriz polimérica provém basicamente dessa sensibilidade dos espectros de RPE à mobilidade rotacional, pois o sistema em estudo pode apresentar alterações físico-químicas dependentes do solvente ou pH empregados, e que se refletem também numa variação da velocidade de rotação da sonda presente nesse sistema.

Em termos quantitativos, a velocidade e difusão rotacional das moléculas são analisadas usualmente através do cálculo do tempo de correlação rotacional (τ), cuja unidade é segundo/radiano. A teoria para o cálculo de τ de radicais nitróxidos, a partir de larguras e alturas dos três picos de absorção,

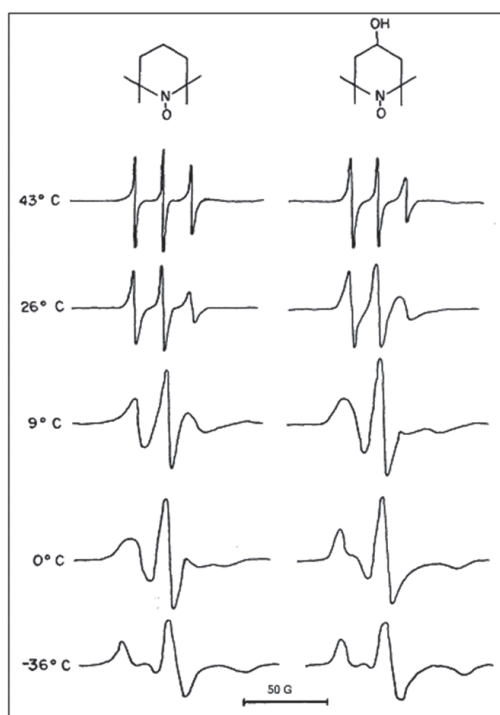


Figura 6.10 Espectros marcadores de *spin* Tempo e Tempol em glicerol.

foi desenvolvida anteriormente^{56,57} e gera dois valores de τ (τ_B e τ_C), a partir de duas expressões diferentes descritas por Cannon⁵⁸.

$$\text{(Equação 6.2)} \quad \tau_C = 6,55 \times 10^{-10} W_0 [(h_0/h_{+1})^{1/2} + [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 2] \text{ s/rad}$$

$$\text{(Equação 6.3)} \quad \tau_B = 5,90 \times 10^{-10} W_0 [(h_0/h_{-1})^{1/2} - [(h_0/h_{+1})^{1/2}] \text{ s/rad}$$

em que W_0 é a largura da linha central em Gauss, e h_{-1} , h_0 e h_{+1} são, respectivamente, as amplitudes das primeiras derivadas das linhas de absorção do campo alto, médio e baixo.

A utilização desse parâmetro τ limita-se, na realidade, a movimentos bastante rápidos e isotrópicos, como é o caso de marcadores pequenos livres em solução ou ligados a macromoléculas pequenas, como é o caso dos peptídeos. Nesse caso, quanto menor o valor de τ , mais rápida é a rotação molecular. Os valores de τ atingem escalas ao redor de 10^{-11} a 10^{-10} s^{-1} . Em casos em que o marcador se encontra agora ligado a estruturas maiores, como em polímeros ou peptidil-polímeros, ocorre a sobreposição de espectros de componentes de diferentes mobilidades (mais lentos), inviabilizando a utilização de τ . Lança-se mão, então, usualmente, do termo W_0 (largura em Gauss do pico central). Quanto maior esse valor, mais imóvel e ordenado se encontra o sítio onde o marcador de *spin* se encontra ligado. Além do uso do W_0 para essas situações, há a proposição do uso do termo espectral $h-1/h_0$. Contrariamente ao W_0 , quanto maior o seu valor, maior é a velocidade motricional do local do sistema marcado^{46,59-61}.

Ao final, existe outra importante aplicação da RPE relacionada à sensibilidade do espectro do radical nitróxido à polaridade do meio, e isto se deve basicamente à existência de duas formas canônicas desse composto (Figura 6.11).

Na estrutura I, o elétron desemparelhado está preferencialmente localizado no átomo de oxigênio. Na estrutura II, encontra-se no de nitrogênio. Quando o radical está em meio bastante polar, como a água, a tendência é a de predominar a estrutura II, o inverso ocorrendo em um meio mais apolar. A avaliação da localização do elétron desemparelhado e, conseqüentemente da polaridade do meio, é feita através dos valores do desdobramento hiperfino isotrópico (a_N) e do fator g isotrópico. Quanto mais o elétron desemparelhado interagir com núcleo de nitrogênio (estrutura II), maior será o valor de a_N e menor o de g ⁶². Em geral, a_N varia aproximadamente de 14,5 Gauss em solventes apolares, como benzeno ou dioxano, a valores ao redor de 16,0 Gauss em água.

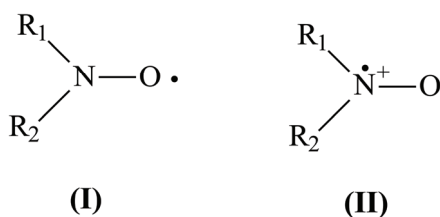


Figura 6.11 Formas canônicas do radical nitróxido.

Experimentos de RPE: marcação das amostras por TOAC e detalhes operacionais

Experimentos foram efetuados em um espectrômetro Bruker modelo ER 200 e celas de quartzo, com capacidade aproximada de 0,2 mL, proveniente de J. Scalón, Costa Mesa, Califórnia e que se encontra instalado no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Os espectros de resinas e peptidil-resinas foram obtidos à temperatura ambiente (22 ± 2 °C), em diferentes solventes orgânicos (). Foram feitos, em geral, de dois a três experimentos para cada amostra. As resinas foram marcadas com o composto Fmoc-TOAC, pelo método DIC/HOBT em DMF por duas horas, embebidas por uma noite no solvente desejado, e uma pequena porção foi adicionada à cela de quartzo para a obtenção dos espectros de RPE. Acopla-se usualmente apenas cerca de 5% (mol/mol) do marcador Fmoc-TOAC em relação ao teor de grupos amínicos da resina. Essa baixa marcação evita o surgimento de interações do tipo *spin-spin*^{36,54} entre os marcadores dentro do grão da resina, afetando as larguras dos picos espectrais da RPE e dificultando a determinação correta dos parâmetros espectrais desejados. Após a marcação, trata-se a resina com solução de 20% piperidina em DMF por 20 minutos para remoção do grupo Fmoc. Após isso, lava-se várias vezes a peptidil-resina marcada com DMF e DCM, em funil de placa porosa.

De um modo geral, o tempo de varredura foi de 4 minutos, a constante de tempo de 0,1; a amplitude de modulação até um máximo de 0,5 G, a potência de micro-ondas de 5 mW e a frequência de 9,5 GHz. Todos os espectros foram feitos em intervalo de campo de 100 G, centralizando-se o pico central ao redor de 3.450 G, a 22 °C.

6.2.3 TOAC: histórico e aplicação em estudos de peptídeos e de solvatação de peptidil-resinas

6.2.3.1 Histórico

Apesar de décadas terem se passado após a introdução da RPE, este método espectroscópico que se baseia na introdução de um composto radicalar estável no sistema em estudo havia sido esparsamente empregado no estudo conformacional de peptídeos biologicamente ativos. Isso se devia, em parte, à inexistência de um marcador de *spin* do tipo aminoácido disponível comercialmente. Nosso laboratório foi o primeiro a introduzir, no início da década de 1980, uma estratégia química que permitiu o uso do TOAC⁶³ (ver Figura 6.12) na SPFS. A derivação desse marcador de *spin* com o protetor amínico ácido-lábil terc-butiloxicarbonila (Boc), empregado rotineiramente na estratégia Boc da SPFS, viabilizou finalmente a ligação covalente desse composto radicalar na extremidade N-terminal de cadeias peptídicas^{64,65}. Obtiveram-se, assim, com o emprego do composto Boc-TOAC, os primeiros peptídeos paramagnéticos contendo esse marcador, dentre os quais o dipeptídeo Toac-Gly e os análogos (Toac⁰- e Toac¹-AngII), em que AngII é o peptídeo hipertensor angiotensina II, caracterizado pela sequência DRVYIHPF^{66,67}.

Não havia, no entanto, naquela época, uma estratégia que permitisse a introdução do TOAC em posições internas de uma cadeia peptídica, pois esse radical livre parece sofrer degradação irreversível nas sucessivas etapas de tratamento da peptidil-resina com ácido trifluoroacético (TFA), necessárias para a remoção do grupo protetor amínico Boc e posterior acoplamento

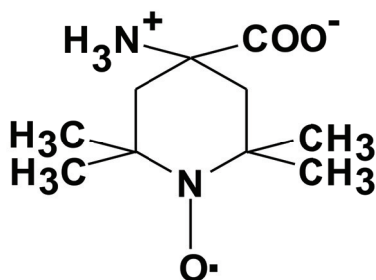


Figura 6.12 TOAC: ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico.

do resíduo seguinte da cadeia peptídica (Figura 6.3). Embora o radical nitróxido seja bastante estável graças ao arcabouço formado pelas quatro metilas vizinhas ao radical N-O, à ausência de H nos carbonos adjacentes e à existência de formas ressonantes desse grupamento⁶⁸, esse tipo de radical pode sofrer, em meio ácido forte, um processo de protonação seguido de desproporcionamento e posterior decomposição⁶⁹.

Foi somente após mais de uma década que foi proposta na literatura uma estratégia química de introdução do TOAC em posições internas de sequências peptídicas⁷⁰. Isso foi possível através da utilização alternativa do protetor amínico base-lábil Fmoc^{18,71}, já descrito. Com o emprego do derivado Fmoc-TOAC, tornou-se viável o crescimento da cadeia peptídica mesmo após a introdução do TOAC, fazendo-o através do método alternativo de síntese Fmoc. Nesse protocolo alternativo, o composto radicalar TOAC não é submetido em nenhum momento a tratamento ácido com TFA até o final da síntese, mantendo-se, portanto a integridade de sua estrutura.

Como, contudo, na etapa final de clivagem do peptídeo da resina por esta estratégia de síntese emprega-se um tratamento ácido forte que contém cerca de 80% (v/v) de TFA (reagente K)¹⁸, que degrada bastante o TOAC, essa solução foi substituída pelo HF anidro, utilizado na estratégia inicial de síntese peptídica já mencionada e que emprega a proteção Boc (ver Figura 6.3). Nesse meio ácido anidro, observou-se que ocorre apenas protonação do grupo N-O, que pode ser revertido por tratamento em meio alcalino^{64,65}. Essa estratégia química alternativa que permite a introdução de TOAC internamente em cadeias peptídicas envolve, portanto, uma mistura dos protocolos dos métodos de síntese, via Boc, para a etapa de clivagem final do peptídeo da resina, e via Fmoc, para o do crescimento da cadeia peptídica. O análogo TOAC⁷-AngII sintetizado por essa estratégia transformou-se, desse modo, no primeiro exemplo de peptídeo da literatura com um marcador de *spin*⁷⁰, contido internamente em sua estrutura primária.

Diferentemente de estratégias opcionais de marcação paramagnética de macromoléculas em que se empregam marcadores de *spin* mais longos ou mais flexíveis, usualmente na cadeia lateral da cisteína⁷² (ver Figura 6.13), o uso de um marcador do tipo aminoácido, como o TOAC, é mais conveniente. Isso se deve à estrutura especial desse marcador. Seu C^α, que contém os grupamentos amínicos e carboxílicos para a sua inserção no meio da cadeia peptídica, está no mesmo anel cíclico que contém o centro paramagnético nitróxido. Desse modo, esse marcador de *spin* é mais sensível a qualquer alteração no sistema ao qual se encontra ligado, pois não existem tantas ligações simples separando-os como ocorre com outros marcadores de *spin*.

(CD), tanto em solução⁷⁵⁻⁷⁸ quanto em micelas^{79,80}. Estudo similar tem sido desenvolvido também com o peptídeo vasoativo AngII^{65,76}. Além disso, o peptídeo responsável, entre diversas outras funções fisiológicas, pela coloração da epiderme de mamíferos (peptídeo estimulador de α -melanócito, ou α -MSH)⁸¹ e um análogo mais potente⁸² também foram marcados com TOAC e investigados em termos conformacionais em solução e em sistema membrana-mimético^{78,83}. Além desses exemplos, outros, como estudos via TOAC do neuropeptídeo Y⁸⁴, da substância P⁸⁵ e de peptídeos antimicrobianos^{86,87}, continuam em andamento.

Além desse tipo de enfoque voltado mais para peptídeos de relevância fisiológica, existem outros que empregam o TOAC para fins de enfoques estruturais de peptídeos em geral. Dentre estes, há menção a estruturas especiais em α -hélice de segmentos peptídicos-modelo⁸⁸ e outros correlatos desenvolvidos principalmente pelo grupo de Toniolo e colaboradores e nos últimos anos de outros pesquisadores, que aplicaram inclusive a estratégia de simples ou dupla marcação com TOAC de cadeias peptídicas⁸⁹⁻⁹¹. Além desse tipo de aplicação de relevância estrutural de peptídeos, tem-se estendido também o estudo das características do próprio marcador TOAC^{92,93} e seu emprego na análise da interação de fragmentos peptídicos em bicamadas e micelas^{94,95} ou de mecanismo de ação de receptores, do tipo GPCR⁹⁶⁻⁹⁸, e mesmo de especificidade de enzimas⁹⁹.

Por fim, além do TOAC, nosso laboratório também procurou encontrar um outro marcador do tipo aminoácido que possuísse um grupamento amínimo mais reativo que o do TOAC. Foi desse modo que iniciamos os estudos do POAC (2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil-3-amino-4-carboxílico, Figura 6.14), descrito inicialmente por Rassat e Rey (1967)⁶³, mas utilizado pelo nosso grupo para marcação de cadeias peptídicas¹⁰⁰. Por ser um composto quiral, alguns trabalhos procuraram obter formas enantioméricas purificadas desse composto cíclico^{101,102}. Nosso grupo tem procurado resolver o problema da separação quiral dos componentes do POAC por meio de protocolos cromatográficos alternativos¹⁰³.

6.2.3.3 Estudo da solvatação de peptidil-resinas pela espectroscopia da RPE

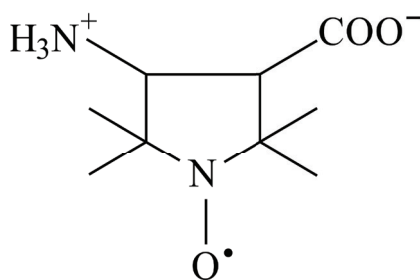
Este último tópico procura mostrar alguns avanços e potencialidades de aplicação da RPE via emprego do marcador TOAC, pioneiramente utilizado para complementação dos estudos de solvatação de peptidil-resina,

já iniciada com a metodologia da leitura dos grãos em microscopia ótica comum. O objetivo final tem sido o de ajudar a entender melhor esse complexo processo do crescimento da cadeia peptídica dentro do grão de polímeros, dependente de inúmeros fatores, e, assim, ajudar no aprimoramento da SPFS. O emprego alternativo da RPE permite, com o uso da molécula repórter TOAC, obter dados físico-químicos da dinâmica das cadeias peptídicas em conjugação com o de uma matriz polimérica no estado solvatado.

Diversos trabalhos puderam ser publicados, os quais serão listados adiante, mas os pontos principais para entender a validade dessa estratégia alternativa e única estão na obtenção de dados de alguns parâmetros espectrais da RPE, que já descrevemos como relevantes para a avaliação de dados de mobilidade e existência ou não de algum tipo de impedimento espacial na cadeia peptídica em crescimento. Dentre esses, temos o W_0 , que corresponde à largura do pico central do espectro de RPE, e foi possível ainda propor alternativamente o termo também espectral $h-1/h_0$. Quanto maior o valor de W_0 ou menor o de $h-1/h_0$, maior a imobilização do local onde se encontra localizada a sonda TOAC^{36,46,59,61}.

Antes de apresentar dados mais concretos, numéricos, relativos a essas afirmações, é preciso observar que claras diferenciações espectrais existem entre um marcador pequeno livre em solução; um já ligado a uma molécula maior, como um peptídeo; e, finalmente um ligado a uma macromolécula de dimensões bem maiores, representada pelo grão de uma peptidil-resina”.

A Figura 6.15A destaca essa diferenciação espectral entre esses três casos, notando-se picos mais estreitos no TOAC, seguido do TOAC-peptídeo e,



POAC

Figura 6.14 POAC: Ácido 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-óxido-3-amino-4-carboxílico.

finalmente, quando esse marcador se encontra ligado à extremidade peptídica da sequência AAAAD acoplado à MBAR. Observa-se que esse alargamento é mais facilmente observável no pico de campo magnético mais alto ($h-1$), pois é o mais sensível a alterações motricionais do meio, se comparado com os outros dois de absorção em campos magnéticos menores. A Figura 6.15B destaca os espectros da TOAC-AAAAD-MBAR, mas em três solventes diferentes, indicando maior mobilidade em DMF e menor em DMSO, exatamente de acordo com o grau de inchamento dessa peptidil-resina nesses solventes e pelos valores de W_o ¹⁰⁴.

A Tabela 6.6 abaixo reforça essas informações, destacando a já observada correlação entre grau de inchamento por microscopia e grau de mobilidade, indicado pelos valores de W_o , mas agora apresentando também os dados de velocidade da reação de acoplamento. A correlação é direta entre esses termos, sendo o solvente polar DMSO o mais indicado para essa síntese, por ter se mostrado em melhor condição de solvatação dessa peptidil-resina. Por conter elevado conteúdo peptídico (mais de 50%), tende a ser melhor solvatada no DMSO do que nos mais comumente utilizados DCM ou DMF. Esses dados são complementares de estudos ainda em andamento⁶⁰.

Tabela 6.6 Correlação entre grau de inchamento, W_o e rendimento de acoplamento (5%) da Boc-Ala na AAIIV-BHAR (53% conteúdo peptídico)

| SOLVENTE | VOLUME DE SOLVENTE NO GRÃO ^a (%) | W_o (GAUSS) | ACOPLAMENTO ^b (%) |
|----------|---|---------------|------------------------------|
| DCM | 38 | 4.6 | 11 |
| DMF | 48 | 3.2 | 27 |
| DMSO | 72 | 1.6 | 49 |

^a $[(\text{volume solvatado} - \text{volume seco}) / \text{volume solvatado}] \times 100$; ^b Acoplamento após 15 min. com o método da carbodiimida. Agentes acilantes em $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e com excesso molar de $1,5 \times$ sobre o total de componente amínico.

Ainda apresentando dados que reforçam a importância do emprego da RPE nesse tipo de investigação, a Figura 6.16 nos mostra o acompanhamento do acoplamento do Boc-TOAC em uma peptidil-resina, monitorada agora pelos valores espectrais de $h-1/h_o$ ⁶¹. Observa-se que esse parâmetro espectral da RPE vai tendo o seu valor aumentado à medida que o tempo de acoplamento ocorre, atingindo-se um patamar ao redor de 200 minutos a 300 minutos. Esse dado é, portanto indicativo de que a imobilização crescente detectada pelo aumento dos valores de parâmetro deve-se ao

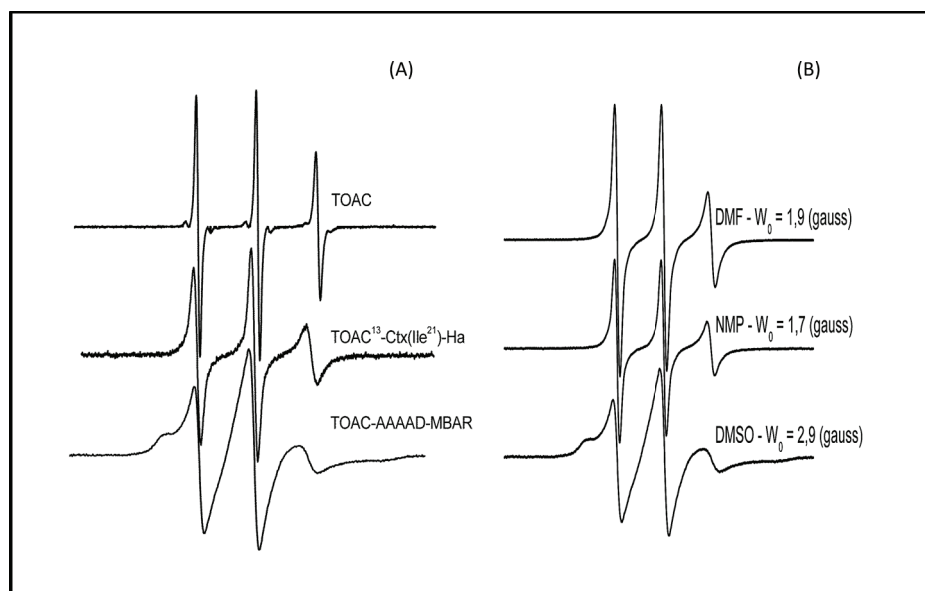


Figura 6.15 (A) Espectros de RPE de TOAC (em tampão PBS, pH 7), TOAC13-Ctx(Ile21) - Ha* (em tampão fosfato, pH 7) e TOAC-AAAAD-MBAR em DMSO; (B) espectros de RPE de TOAC-AAAAD-MBAR (0,5 mmol/g) em DCM, NMP e DMSO e os correspondentes valores de W_0 .

acoplamento tempo-dependente de todas as moléculas do marcador, ligando-se em uma macromolécula bem maior (peptidil-resina), responsável, portanto pelo aumento de sua imobilização molecular e estabilização com valores ao redor de 0,27.

Um aspecto relevante nesse tipo de estudo da solvatação por RPE, se comparado ao da estratégia de medidas de grãos por microscopia, reside no fato de se poder, por exemplo, via emprego do TOAC, desenvolver um trabalho mais diferenciado nessa área⁶⁰, que propõe uma estratégia de obtenção de informações estruturais inéditas como, por exemplo, o número de sítios peptídicos por grão de cada resina e também a distância entre estes, em Å. Essas informações adicionais se tornaram bastante úteis na interpretação de alguns resultados da SPFS, pois confirmaram que quanto maior a distância entre os sítios, menor o impedimento espacial e, portanto, maior a velocidade na reação da entrada de um novo aminoácido durante o crescimento peptídico. A Tabela 6.7 exemplifica com o estudo do acoplamento comparativo (em DCM) de um resíduo de aminoácido em três lotes de uma

mesma peptidil-resina, mas com conteúdos peptídicos diferentes no grão. Essas amostras possuem, portanto, valores de distância intercadeias distintas e calculadas pela estratégia mencionada⁶⁰. Os valores de distância entre os sítios variam de 38 Å a 17 Å nessas peptidil-resinas; na que apresenta o maior valor de distância, ocorre reação de acoplamento mais eficiente (86% contra 21%, respectivamente), devido ao menor grau de impedimento espacial dentro do grão.

Tabela 6.7 Correlação entre acoplamento de Boc-(2BrZ)-Tyr e valores de distância entre sítios da peptidil-resina ING-MBAR, em DCM

| ING-MBAR (MMOL/G) ^a | DISTÂNCIA ENTRE SÍTIOS (Å) | ACOPLAMENTO ^b (%) |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 0,19 | 38 | 86 |
| 0,54 | 33 | 63 |
| 1,16 | 17 | 21 |

Legenda: ^a Grau de substituição de ING; ^b Rendimento de acoplamento de Boc-(2BrZ)Tyr (15 minutos, a 25 °C), método anidrido simétrico, em condições equimolares (10 mmol L⁻¹ de concentração dos reagentes).

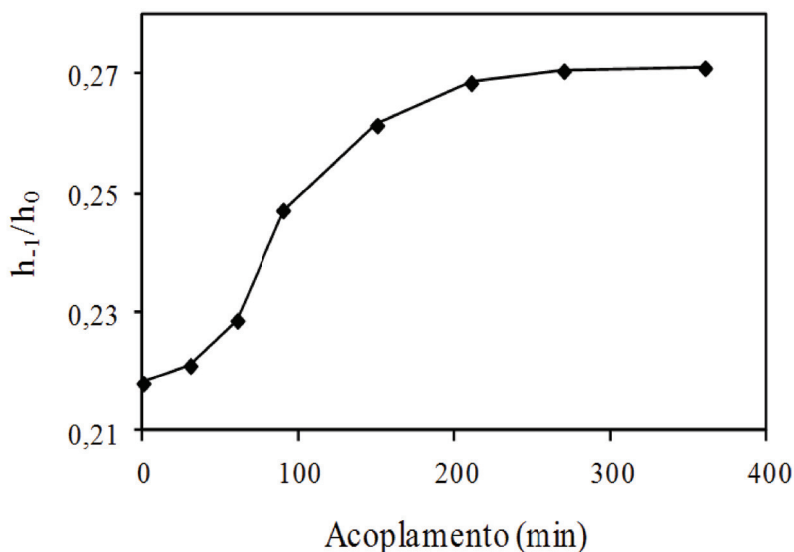


Figura 6.16 Correlação entre os valores espectrais de h_{-1}/h_0 e o tempo de acoplamento de Boc-TOAC em (NANP)4-MBAR (1,5 mmol/g). As reações ocorreram a 25 °C em DMF pelo método da carbodiimida, em condições equimolares dos reagentes (2 mmol.L⁻¹).

Em conclusão, percebe-se que dados adicionais, específicos do microambiente, onde ocorre o crescimento da cadeia peptídica, podem ser obtidos conjugando-se RPE e valores de inchamento obtidos por microscopia, deixando em aberto possibilidades de proposição de melhorias em algumas etapas do método da SPFS. Talvez por essas razões, o artigo que introduz essa estratégia de determinação de parâmetros estruturais inéditos do interior dos grãos de peptidil-resinas, desenvolvidas via emprego conjugado de RPE-TOAC e inchamento⁶⁰, acabou sendo selecionado na época da publicação para compor, em termos figurativos, a capa do volume de uma importante revista da área de química orgânica, o *Journal of Organic Chemistry* (ver Figura 6.17).

Existem na literatura, logicamente, outros métodos espectroscópicos que procuram também obter informações físico-químicas relevantes quanto à solvatação de peptidil-resinas. Esse é o caso da ressonância magnética nuclear (NMR)^{105,106}, do dicroísmo circular (CD)¹⁰⁷, da fluorescência¹⁰⁸ e do infravermelho do tipo transformada de Fourier (FT-IR)^{31,109,110}. De qualquer modo, comparativamente, a técnica da RPE apresenta uma vantagem única sobre todas essas espectroscopias em termos de aplicação no aprimoramento da SPFS: contrariamente aos demais métodos, que detectam detalhes nutricionais e ordenamento do sistema como um todo, a RPE fornece dados específicos a respeito de onde o marcador se encontra, isto é, usualmente na extremidade amínica da cadeia peptídica em crescimento. Essa informação é crucial para a SPFS, pois permite antever uma maior ou menor liberdade de rotação dessa extremidade amínica para a importante etapa de acoplamento, sem estar refletindo a dinâmica de todo o sistema marcado.

6.3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como enfatizado na parte introdutória, o objetivo deste capítulo foi o de descrever, de forma sucinta, a aplicação de uma estratégia diferenciada que emprega a RPE e um marcador de *spin* adequado, do tipo aminoácido (TOAC), para acoplar-se em peptídeos-resina, objetivando entender adequadamente o complexo processo de solvatação durante o crescimento das cadeias peptídicas com base na mundialmente empregada metodologia da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Um conjunto de dados experimentais foi descrito, dentro do limite disponível, mas acreditamos que foram suficientes para que fossem visualizadas importantes assertivas relacionadas a essa metodologia. Dentre estas, pode-se destacar a importância crítica

de uma boa solvatação, refletida em um aumento da dinâmica e redução do grau de impedimento espacial no interior da matriz polimérica de uma peptidil-resina. Como consequência, obtém-se aumento da eficiência, por exemplo, da importante reação de acoplamento de aminoácidos. Por ser uma estratégia alternativa e ainda pouco empregada, acredita-se que essa



Figura 6.17 Capa da revista de junho de 2005 do *Journal of Organic Chemistry*. Reimpresso com permissão de Marchetto et al., 2005⁶⁰. Copyright (2005) American Chemical Society.

conjugação da RPE-inchamento por microscopia dos grãos é extremamente valiosa para se entender melhor detalhes físico-químicos no microambiente em que ocorre o crescimento peptídico, possibilitando a visualização de contínuas proposições de alternativas para as diferentes etapas químicas que

estão presentes na SPFS. Pela importância atual de peptídeos na área da saúde, prevemos o surgimento de diversas sublinhas de pesquisa no decorrer dos próximos anos, juntamente com a também extensa área que envolve polímeros em geral.

REFERÊNCIAS

1. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis 1. Synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 1963;85(14):2149-54.
2. Kastin AJ. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Burlington: Elsevier Inc.; 2006.
3. Campbell MK. *Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Artmed; 2000.
4. Lansbury PT. In Pursuit of the Molecular-Structure of Amyloid Plaque – New Technology Provides Unexpected and Critical Information. *Biochemistry*. 1992;31(30):6865-70.
5. De Felice FG, Vieira MNN, Meirelles MNL, Morozova-Roche LA, Dobson CM, Ferreira ST. Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure. *Faseb Journal*. 2004;18(7):1366-72.
6. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacology Reviews*. 2005;57(1):27-77.
7. McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, et al. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(17):7724-8.
8. Narita M, Umeyama H, Yoshida T. Peptide segment separation by tertiary peptide-bonds [X-Pro and X-(Z)Y]. Synthesis and conformational-analysis of cross-linked polystyrene resin-bound human proinsulin C-peptide fragments. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1989;62(11):3577-81.
9. Malavolta L, Nakaie CR. Peptide dissociation in solution or bound to a polymer: comparative solvent effect. *Tetrahedron*. 2004;60(42):9417-24.
10. Malavolta L, Pinto MRS, Cuvero JH, Nakaie CR. Interpretation of the dissolution of insoluble peptide sequences based on the acid-base properties of the solvent. *Protein Science*. 2006;15(6):1476-88.
11. Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, Boyer HW. Expression in *Escherichia-Coli* of a chemically synthesized gene for hormone Somatostatin. *Science*. 1977;198(4321):1056-63.
12. Jakubke HD. Enzymatic Peptide Synthesis. In: Judenfriend S, Meienhofer J, editors. *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. New York: Academic Press; 1987. p. 103-165.
13. Miranda MTM, Morita H, Tominaga M. Transesterification of Moz-Asn-Leu-Gly-Oet in methanol – confirmation of Ca-2+ mediated catalysis. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 1991;37(4):299-305.
14. Du Vigneaud V, Katsoyannis PG. The synthesis of p-toluenesulfonyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparagine and related peptides. *Journal of the American Chemical Society*. 1954;76(12):3113-5.

15. Barany G, Merrifield RB. The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology. In: Gross E, Meienhofer J, editors. *Special Methods in Peptide Synthesis*. Vol. II. New York: Academic Press; 1980. p. 1-284.
16. Stewart JM, Young JD. *Solid Phase Peptide Synthesis*. Rockford: Pierce Chemical Company; 1984.
17. Atherton E, Sheppard RC. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford: I. L. R. Press; 1989.
18. Fields GB, Noble RL. Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 1990;35(3):161-214.
19. Martin L, Ivancich A, Vita C, Formaggio F, Toniolo C. Solid-phase synthesis of peptides containing the spin-labeled 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid (TOAC). *Journal of Peptide Research*. 2001;58(5):424-32.
20. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*. 1970;34(2):595-8.
21. Yajima H, Fujii N, Ogawa H, Kauatani H. Trifluoromethanesulphonic acid, as a deprotecting reagent in peptide chemistry. *Journal of the Chemical Society*. 1974:107-8.
22. Mitchell AR, Erickson BW, Ryabtsev MN, Hodges RS, Merrifield RB. Tert-Butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide-synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1976;98(23):7357-62.
23. Meldal M. *Methods in Enzymology: Solid Phase Peptide Synthesis*. G.B. Fields, editor. Academic Press; 1997. p. 83-103.
24. Kates SA, Albericio F. *Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide*, in *Solid-Phase Synthesis*. New York: M. Dekker; 2000. p. 275-330.
25. Jubilot GN, Miranda MT, Tominaga M, Okada Y, Miranda A, Nakaie CR. Resin selection based on the lability of peptidyl-resin linkage towards HF and TFA steps: Dependence on the C-terminal amino acid and peptide length. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1999;47(11):1560-3.
26. Jubilot GN, Cilli EM, Tominaga M, Miranda A, Okada Y, Nakaie CR. Evaluation of the trifluoromethanesulfonic acid/trifluoroacetic acid/thioanisole cleavage procedure for application in solid-phase peptide synthesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2001;49 (9):1089-92.
27. Jubilot GN, Cilli EM, Crusca E, Silva EH, Okada Y, Nakaie CR. Comparative investigation of the cleavage step in the synthesis of model peptide resins: implications for N-alpha-9-fluorenylmethoxycarbonyl-solid phase peptide synthesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;55(3):468-470.

28. Nakaie CR, Miranda A, Miranda MTM, Oliveira E, Marchetto R, Malavolta L, Cilli EM, Tominaga M, Okada Y, Jubilot GN. Acid cleavage reactions of amino acids and peptides bound to polymers: Relevance for peptide synthesis methodology. In: Nantes IL, Brochsztain S, editors. *Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media*. Kerala: Research Signpost; 2007. p. 141-60.
29. Bedford J, Hyde C, Johnson T, Jun W, Owen D, Quibell M, Sheppard RC. Amino-acid structure and difficult sequences in solid-phase peptide-synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 1992;40(3-4):300-3.
30. Hancock WS, Prescott DJ, Vagelos PR, Marshall GR. Solvation of polymer matrix – source of truncated and deletion sequences in solid-phase synthesis. *Journal of Organic Chemistry*. 1973;38(4):774-81.
31. Remuzgo C, Andrade GFS, Temperini MLA, Miranda MTM. Acanthoscurrin fragment 101-132: total synthesis at 60 °C of a novel difficult sequence. *Biopolymers*. 2009;92(1):65-75.
32. Cilli EM, Marchetto R, Schreier S, Nakaie CR. Use of spin label EPR spectra to monitor peptide chain aggregation inside resin beads. *Tetrahedron Letters*. 1997;38(4):517-20.
33. Kent SBH. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 1988;57:957-89.
34. Nakaie CR, Oliveira E, Vicente EF, Jubilot GN, Souza SEG, Marchetto R, Cilli EM. Solid-phase peptide synthesis in highly loaded conditions. *Bioorganic Chemistry*. 2011;39(1-3):101-9.
35. Marchetto R, Etchegaray A, Nakaie CR. Kinetics of synthesis and swelling studies of highly substituted benzhydrylamine-resins: implications for peptide synthesis and perspectives for use as anion exchanger resin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 1992;3(1 e 2):30-7.
36. Berliner LJ, Reuben J. *Spin Labeling: Theory and Applications*. New York: P. Press; 1989.
37. Wertz J, Bolton JR. *Eletron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. New York: Mc Graw-Hill; 1972.
38. Sarin VK, Kent SBH, Merrifield RB. Properties of swollen polymer networks – solvation and swelling of peptide-containing resins in solid-phase peptide-synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1980;102(17):5463-70.
39. Nakaie CR, Marchetto R, Schreier S, Paiva ACM. High-loading effect in solid phase peptide synthesis. In: Rivier J, Marshall GR, editors. *Peptide: Chemistry, Structure and Biology*. Leiden: ESCOM; 1990.
40. Becker H, Lucas HW, Maul J, Pillai VNR, Anzinger H, Mutter M. Polyethyleneglycols grafted onto crosslinked polystyrenes – a new class of hydrophilic polymeric supports for peptide-synthesis. *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications*. 1982;3(4):217-23.

41. Pietta PG, Cavallo PF, Takahash K, Marshall GR. Preparation and use of benzhydrylamine polymers in peptide-synthesis .2. Syntheses of thyrotropin releasing hormone, thyrocalcitonin 26-32, and eledoisin. *Journal of Organic Chemistry*. 1974;39(1):44-8.
42. Matsueda GR, Stewart JM. A P-Methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides*. 1981;2(1):45-50.
43. Cilli EM, Oliveira E, Marchetto R, Nakaie CR. Correlation between solvation of peptide-resins and solvent properties. *Journal of Organic Chemistry*. 1996;61(25):8992-9000.
44. Malavolta L, Oliveira E, Cilli EM, Nakaie CR. Solvation of polymers as model for solvent effect investigation: proposition of a novel polarity scale. *Tetrahedron*, 2002;58(22):4383-94.
45. Gutmann V. *The Donor-Acceptor Approach to Molecular Interactions*. New York: Plenum Press; 1978. p. 595.
46. Oliveira E, Cilli EM, Miranda A, Jubilit GN, Albericio F, Andreu D, Paiva ACM, Schreier S, Tominaga M, Nakaie CR. Monitoring the chemical assembly of a transmembrane bradykinin receptor fragment: Correlation between resin solvation, peptide chain mobility, and rate of coupling. *European Journal of Organic Chemistry*. 2002;21:3686-94.
47. Malavolta L, Poletti EF, Silva EH, Schreier S, Nakaie CR. Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy for validation of the novel (AN+DN) solvent polarity scale. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008;9(7):1321-32.
48. Malavolta L, Pinto MR, Nakaie CR. Assessment of the aggregation propensity of the beta-amyloid peptide during the synthesis and when free in solution. *Protein and Peptide Letters*. 2013;20:848-55.
49. Dimroth K, Reichardt C, Siepmann T, Bohlman F. Über pyridinium-N-phenol-betaine und ihre verwendung zur charakterisierung der polarität von lösungsmitteln. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1963;661(1):1-37.
50. Hildebrand JH. A critique of the theory of solubility of non-electrolytes. *Chemical Reviews*. 1949;44(1):37-45.
51. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*. 1980;32(1):1-46.
52. Cilli EM, Jubilit GN, Ribeiro SCF, Oliveira E, Nakaie CR. Importance of the solvation degree of peptide-resin beads for amine groups determination by the picric acid method. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2000;11(5):474-8.
53. Ribeiro SCF, Schreier S, Nakaie CR, Cilli EM. Effect of temperature on peptide chain aggregation: an EPR study of model peptidyl-resins. *Tetrahedron Letters*. 2001;42(19):3243-6.

54. Schreier S, Polnaszek CF, Smith ICP. Spin labels in membranes: problems in practice. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1978;515(4):375-436.
55. Hubbell WL, McConnell HM. Motion of steroid spin labels in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1969;63(1):16-22.
56. Kivelson D. Theory of ESR linewidths of free radicals. *Journal Chemistry Physics*. 1960;33:1094-1106.
57. Freed JH, Fraenkel GK. Theory of linewidths in electron spin resonance spectra. *Journal of Chemical Physics*. 1963;39(2):326-348.
58. Cannon B, Polnaszek CF, Butler KW, Eriksson LE, Smith IC. The fluidity and organization of mitochondrial membrane lipids of the brown adipose tissue of cold-adapted rats and hamsters as determined by nitroxide spin probes. *Arch Biochem Biophys*. 1975;167(2):505-18.
59. Cilli EM, Marchetto R, Schreier S, Nakaie CR. Correlation between the mobility of spin-labeled peptide chains and resin solvation: An approach to optimize the synthesis of aggregating sequences. *Journal of Organic Chemistry*. 1999;64(25):9118-23.
60. Marchetto R, Cilli EM, Jubilut GN, Schreier S, Nakaie CR. Determination of site-site distance and site concentration within polymer beads: A combined swelling-electron paramagnetic resonance study. *Journal of Organic Chemistry*. 2005;70(12):4561-8.
61. Nakaie CR, Malavolta L, Schreier S, Trovatti E, Marchetto R. Direct electron paramagnetic resonance monitoring of the peptide synthesis coupling reaction in polymeric support. *Polymer*. 2006;47(13):4531-6.
62. Briere R, Lemaire H, Rassat A. Nitroxides XV: Synthèse et étude de radicaux libres stables piperidiniques et pyrrolidiniques. *Bulletin de la Societe Chimique de France*. 1965:3273-83.
63. Rassat A, Rey P. Nitroxides. 23. Preparation of amino-acid free radicals and their complex salts. *Bulletin de la Societe Chimique de France*. 1967;3:815-8.
64. Nakaie CR, Goissis G, Schreier S, Paiva ACM. pH-dependence of electron-paramagnetic-res spectra of nitroxides containing ionizable groups. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1981;14(2-3):173-80.
65. Nakaie CR, Schreier S, Paiva ACM. Synthesis and properties of spin-labeled angiotensin derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1983;742(1):63-71.
66. Catt KJ, Sandberg K, Balla T. Angiotensin II receptors and signal transduction mechanisms. In: Raizada MK, Phillips I, Sumners C, editors. *Cellular and Molecular Biology of Renin-Angiotensin System*. Boca Raton: CRC Press; 1993. p. 307-56.
67. Oliveira L, Costa-Neto CM, Nakaie CR, Schreier S, Shimuta SI, Paiva AC. The angiotensin II AT1 receptor structure-activity correlations in the light of rhodopsin structure. *Physiological Reviews*. 2007;87(2):565-92.
68. Kochi JK. *Free Radicals*. New York: Wiley-Interscience; 1973. p. 493.

69. Rozantsev EG. Free Nitroxyl Radicals. Hazzard BJ, editor. New York/London: Plenum Press; 1970. p. 551-552.
70. Marchetto R, Schreier S, Nakaie CR. A novel spin-labeled amino-acid derivative for use in peptide-synthesis – (9-fluorenylmethoxycarbonyl)-2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-N-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(23):11042-3.
71. Carpino LA, Han GY. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society*. 1970;92(19):5748-9.
72. Miick SM, Martinez GV, Fiori WR, Todd AP, Millhauser GL. Short alanine-based peptides may form 3(10)-helices and not alpha-helices in aqueous-solution. *Nature*. 1992;359(6396):653-5.
73. Schreier S, Bozelli JC, Marin N, Vieira RF, Nakaie CR. The spin label amino acid TOAC and its uses in studies of peptides: chemical, physicochemical, spectroscopic, and conformational aspects. *Biophysical Reviews*. 2012;4(1):45-66.
74. Wilson EK. A New Spin: Peptide Probes. *Chemical & Engineering News*. 2000;78(22):54-9.
75. Schreier S, Barbosa SR, Casallanovo F, Vieira RDF, Cilli EM, Paiva ACM, Nakaie CR. Conformational basis for the biological activity of TOAC-labeled angiotensin II and bradykinin: electron paramagnetic resonance, circular dichroism, and fluorescence studies. *Biopolymers*. 2004;74(5):389-402.
76. Nakaie CR, Silva EG, Cilli EM, Marchetto R, Schreier S, Paiva TB, Paiva ACM. Synthesis and pharmacological properties of TOAC-labeled angiotensin and bradykinin analogs. *Peptides*. 2002;23:65-70.
77. Nakaie CR, Silva EG, Cilli EM, Marchetto R, Carvalho RSH, Jubilut GN, Miranda A, Tominaga M, Schreier S, Paiva TB, Paiva ACM, et al. Synthesis and biological activity of angiotensin II and bradykinin analogues containing the Toac spin label. In: Rodgers R, Epton R, editors. *Peptides*. Birmingham: Mayflower Scientific; 1998. p. 673-4.
78. Barbosa SR, Cilli EM, Lamy-Freund MT, Castrucci AML, Nakaie CR. First synthesis of a fully active spin-labeled peptide hormone. *FEBS Letters*. 1999;446(1):45-8.
79. Vieira RFF, Casallanovo F, Cilli EM, Paiva ACM, Schreier S, Nakaie CR. Conformational studies of TOAC-labeled bradykinin analogues in model membranes. *Letters in Peptide Science*. 2002;9(2-3):83-9.
80. Vieira RF, Casallanovo F, Marin N, Paiva AC, Schreier S, Nakaie CR. Conformational properties of angiotensin II and its active and inactive TOAC-labeled analogs in the presence of micelles. Electron paramagnetic resonance, fluorescence, and circular dichroism studies. *Biopolymers*. 2009;92(6):525-37.
81. Vaudry H. The Melanotropic Peptides. In: Bagnara JT, editor. *General and Comparative Endocrinology*. New York: Academic Press, 1994. p. 294.

82. Sawyer TK, Sanfilippo PJ, Hruby VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett JB, Hadley ME. 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- α -melanocyte-stimulating hormone – a highly potent α -melanotropin with ultralong biological-activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1980;77(10):5754-8.
83. Fernandez RM, Vieira RF, Nakaie CR, Ito AS, Lamy MT. Peptide-lipid interaction monitored by spin labeled biologically active melanocortin peptides. *Peptides*. 2005;26(10):1825-34.
84. Bettio A, Gutewort V, Poppl A, Dinger MC, Zschorning O, Arnold K, Toniolo C, Beck-Sickinger AG. Electron paramagnetic resonance backbone dynamics studies on spin-labelled neuropeptides Y analogues. *Journal of Peptide Science*. 2002;8(12):671-82.
85. Shafer AM, Nakaie CR, Deupi X, Bennett VJ, Voss JC. Characterization of a conformationally sensitive TOAC spin-labeled substance P. *Peptides*. 2008;29(11):1919-29.
86. Moraes LGM, Fazio MA, Vieira RFF, Nakaie CR, Miranda MTM, Schreier S, Daffre S, Miranda A. Conformational and functional studies of gomesin analogues by CD, EPR and fluorescence spectroscopies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1768(1):52-8.
87. Vicente EF, Basso LGM, Cespedes GF, Lorenzon EN, Castro MS, Mendes-Giannini MJS, Costa AJ, Cilli EM. Dynamics and conformational studies of TOAC spin labeled analogues of Ctx(Ile(21))-Ha peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Plos One*. 2013;8(4):e60818.
88. Smythe ML, Nakaie CR, Marshall GR. α -helical versus 3(10)-helical conformation of alanine-based peptides in aqueous-solution – an electron-spin-resonance investigation. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117 (42):10555-62.
89. Toniolo C, Crisma M, Formaggio F. TOAC, a nitroxide spin-labeled, achiral C(α)-tetrasubstituted α -amino acid, is an excellent tool in material science and biochemistry. *Biopolymers*. 1998;47(2):153-8.
90. McNulty JC, Silapie JL, Carnevali M, Farrar CT, Griffin RG, Formaggio F, Crisma M, Toniolo C, Millhauser GL. Electron spin resonance of TOAC labeled peptides: folding transitions and high frequency spectroscopy. *Biopolymers*. 2000;55(6):479-85.
91. Pispisa B, Mazzuca C, Palleschi A, Stella L, Venanzi M, Formaggio F, Toniolo C, Mazaleyrat JP, Wakselman M. Spectroscopic properties and conformational features of short linear peptides in solution: A fluorescence and molecular mechanics investigation. *Journal of Fluorescence*. 2003;13(2):139-47.
92. Toniolo C, Valente E, Formaggio F, Crisma M, Pilloni G, Corvaja C, Toffoletti A, Martinez GV, Hanson MP, Millhauser GL. Synthesis and conformational studies of peptides containing TOAC, a spin-labelled C α , α -disubstituted glycine. *Journal of Peptide Science*. 1995;1(1):45-57.

93. Marsh D. Orientation of TOAC amino-acid spin labels in alpha-helices and beta-strands. *Journal of Magnetic Resonance*. 2006;180(2):305-10.
94. Pertinhez TA, Nakaie CR, Paiva AC, Schreier S. Spin-labeled extracellular loop from a seven-transmembrane helix receptor: studies in solution and interaction with model membranes. *Biopolymers*. 1997;42(7):821-9.
95. Milov AD, Samoilova RI, Tsvetkov YD, De Zotti M, Formaggio F, Toniolo C, Handgraaf JW, Raap J. Structure of self-aggregated alamethicin in EPC membranes detected by pulsed electron-electron double resonance and electron spin echo envelope modulation spectroscopies. *Biophysical Journal*. 2009;96(8):3197-3209.
96. Lopes DD, Vieira RFF, Malavolta L, Poletti EF, Shimuta SI, Paiva ACM, Schreier S, Oliveira L, Nakaie CR. Short peptide constructs mimic agonist sites of AT(1)R and BK receptors. *Amino Acids*. 2013; 44 (3): 835-846.
97. Lopes DD, Poletti EF, Vieira RFF, Jubilut GN, Oliveira L, Paiva ACM, Schreier S, Nakaie CR. A proposed EPR approach to evaluating agonist binding site of a peptide receptor. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2008;14(2):121-6.
98. van Eps N, Anderson LL, Kisselev OG, Baranski TJ, Hubbell WL, Marshall GR. Electron paramagnetic resonance studies of functionally active, nitroxide spin-labeled peptide analogues of the C-terminus of a G-protein alpha subunit. *Biochemistry*. 2010;49(32):6877-86.
99. de Deus Teixeira LG, Bersanetti PA, Schreier S, Carmona AK, Nakaie CR. Analogues containing the paramagnetic amino acid TOAC as substrates for angiotensin I-converting enzyme. *FEBS Lett*. 2007;581(13):2411-5.
100. Tominaga M, Barbosa SR, Poletti EF, Zukerman-Schpector J, Marchetto R, Schreier S, Paiva ACMM, Nakaie CR. Fmoc-POAC: [(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl-3-amino-4-carboxylic acid]: A novel protected spin labeled beta-amino acid for peptide and protein chemistry. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2001;49(8):1027-9.
101. Wright K, Formaggio F, Toniolo C, Torok R, Peter A, Wakselman M, Mazaleyrat JP. First access to the spin-labelled beta-amino acid POAC in an enantiopure state by resolution through its binaphthyl esters. *Tetrahedron Letters*. 2003;44(22):4183-6.
102. Wright K, Dutot L, Wakselman M, Mazaleyrat JP, Crisma M, Formaggio F, Toniolo C. Synthesis, resolution and assignment of absolute configuration of trans 3-amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-4-carboxylic acid (POAC), a cyclic, spin-labelled beta-amino acid. *Tetrahedron*. 2008;64(19):4416-26.
103. Vieira JPF, Poletti EF, Vieira RFF, Veredas V, Santana CC, Nakaie CR. Alternative and simple normal-phase HPLC enantioseparation of a chiral amino acid-type spin label derivative. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2013;24(11):1840-5.

104. Cilli EM, Vicente EF, Crusca E, Nakaie CR. EPR investigation of the influence of side chain protecting groups on peptide-resin solvation of the Asx and Glx model containing peptides. *Tetrahedron Letters*. 2007;48(31):5521-4.
105. Warrass R, Wieruszeski JM, Boutillon C, Lippens G. High-resolution magic angle spinning NMR study of resin-bound polyalanine peptides. *Journal of the American Chemical Society*. 2000;122(8):1789-95.
106. Valente AP, Almeida FCL, Nakaie CR, Schreier S, Crusca E, Cilli EM. Study of the effect of the peptide loading and solvent system in SPPS by HRMAS-NMR. *Journal of Peptide Science*. 2005;11(9):556-63.
107. Pillai VNR, Mutter M. Conformational studies of poly(oxyethylene)-bound peptides and protein sequences. *Accounts of Chemical Research*. 1981;14(4):122-30.
108. Vaino AR, Goodin DB, Janda KD. Investigating resins for solid phase organic synthesis: The relationship between swelling and microenvironment as probed by EPR and fluorescence spectroscopy. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2000;2(4):330-6.
109. Yan B. Monitoring the progress and the yield of solid phase organic reactions directly on resin supports. *Accounts of Chemical Research*. 1998;621-630.
110. Cespedes GF, Vicente EF, Cilli EM, Jubilut GN, Nakaie CR. Use of FTIR in the obtention of resins and peptides synthesis in solid phase. *Química Nova*. 2011;34(4):589-94.

PRODUÇÃO DE BIOADITIVOS

BIOPROCESSOS NA PRODUÇÃO DE ADITIVOS ALIMENTARES

Cristine Rodrigues
Juliana de Oliveira
Mario César Jucoski Bier
Suzan Cristina Rossi
Julio César de Carvalho
Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Michele Rigon Spier
Adriane Bianchi Pedroni Medeiros
Carlos Ricardo Soccol

7.1 INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos e bebidas, aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente sem o propósito de incrementar o valor nutritivo desses produtos. O objetivo de um aditivo é modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de alimentos ou bebidas. Ao agregar-se, poderá resultar que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente desse alimento ou bebida. Essa definição não inclui

os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais¹⁻⁵.

O mercado mundial de aditivos vem sendo dominado majoritariamente pelas classes de aditivos aromatizantes e flavorizantes, melhoradores de sabor, espessantes e hidrocoloides, acidulantes e emulsificantes. Estima-se que esse mercado poderá atingir 33,9 bilhões de dólares em 2015 e 37,7 bilhões de dólares em 2018, conforme projeções da empresa Global Information Inc. 2012⁴, sendo que os pigmentos naturais passarão de 10% para mais de 30% de participação. A mesma tendência é vista no uso de aromas, estabilizantes e acidulantes. No Brasil, a indústria de aditivos também tem crescido intensamente. A produção nacional apresentou um aumento de aproximadamente 80% nos últimos cinco anos.

O aumento da inclusão de aditivos em diferentes produtos, tais como bebidas, ração animal, produtos farmacêuticos, cosméticos e outros, acompanhou o crescimento da população e a demanda de consumo. A necessidade de conservação desses produtos e a melhora de sua qualidade sensorial, além de outros atributos que atraíam a atenção dos consumidores, traz uma crescente demanda pelo uso e aplicação de aditivos⁶. Entretanto, a crescente utilização de aditivos químicos preocupa órgãos ligados à saúde pública e toda a população, devido aos riscos de sua utilização relacionados ao desenvolvimento de diversas doenças, tais como alguns tipos de câncer, lesões neurológicas, intoxicações, processos alergênicos e hiperatividade. Sendo assim, alguns fatores diretos ou indiretos que explicam o crescimento do mercado de bioaditivos estão relacionados à segurança alimentar, saúde e nutrição, especialmente à necessidade do controle de doenças tais como diabetes, obesidade e alergias alimentares. Outros fatores são a necessidade emergencial de agregar valor aos produtos, maior procura por conveniência e praticidade, a demanda de fornecimento contínuo de matérias-primas e menores custos com energia.

A busca crescente por novos produtos aditivos acarreta uma necessidade de se realizar investimentos significativos em pesquisas e desenvolvimento, além da necessidade de aprovações em processos regulatórios⁴.

A avaliação do risco associado ao consumo de aditivos alimentares é realizada pelo Comitê de Especialistas da FAO/OMS* em Aditivos Alimentares (em inglês, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA) desde 1956, além de assessorar o Codex Alimentarius, órgão conjunto da FAO/OMS, em suas decisões. Já no Brasil, é a Agência Nacional de Vigilância

* Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS).

Sanitária (ANVISA), um órgão público, que controla e fiscaliza os aditivos alimentares, bem como os coadjuvantes de tecnologia de fabricação⁷. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 27/2010⁸, os aditivos inscritos na Farmacopeia Brasileira e aqueles utilizados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) estão dispensados da obrigatoriedade de registro na ANVISA.

7.2 HISTÓRICO

A adição de produtos químicos aos alimentos para sua conservação é um processo que tem sido utilizado há séculos. Fumaça, álcool, vinagre, óleo e condimentos são usados há mais de 10 mil anos para preservar alimentos. Após a Revolução Industrial, com o melhor entendimento sobre alimentos e o aumento da demanda em quantidade e qualidade, houve uma oferta na variedade de compostos químicos utilizados para a preservação de alimentos e manutenção de sua cor, sabor e textura^{9,10}.

No início dos anos 1900, o dr. Harvey Wiley, químico chefe do Departamento de Agricultura norte-americano, formou um grupo apelidado de Poison Squad, cujo objetivo foi estabelecer se tais compostos eram prejudiciais à saúde. O documento produzido pelo grupo citava que eram proibidos a fabricação, transporte e comércio interestadual de alimentos adulterados ou mal rotulados¹⁰.

Com o desenvolvimento da tecnologia e crescimento da demanda da população, a produção de aditivos utilizados em alimentos aumentou significativamente a partir dos anos 1950. Na década de 1960, mais de 2.500 diferentes compostos químicos já eram utilizados em alimentos. Em 1962, com o objetivo de desenvolver padrões para alimentos em caráter internacional, foi criada a Comissão do Código Alimentar (Codex Alimentarius Commission). A demanda por novos compostos vem aumentando continuamente, desde então, até os dias de hoje^{10,11}.

7.3 ACIDULANTES

Acidulante pode ser definido – segundo a Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, da ANVISA – como toda substância que aumenta a acidez ou confere um sabor ácido aos alimentos.

Os acidulantes possuem várias funções na indústria de alimentos, tais como conferir um sabor ácido ou “agridoce”, influenciar na textura dos alimentos, conservar alimentos, atuar como agente sequestrante e melhorar a digestibilidade¹².

As substâncias utilizadas como acidulantes, de acordo com a legislação brasileira (RDC nº 45, de 3 de novembro de 2010), são o ácido cítrico, o ácido fumárico, o ácido lático, o ácido málico, o ácido tartárico e o glucono delta lactona. Essas substâncias podem ser encontradas *in natura* ou podem ser obtidas através de processos de fermentação ou síntese química. Pelo processo de fermentação são obtidos os ácidos cítrico, lático, acético e o fumarato de sódio (ácido fumárico).

7.3.1 Ácido cítrico

O ácido cítrico, 2-hidróxido-propano-1,2,3-ácidotricarboxílico (C₆H₈O₇·xH₂O), é um composto intermediário do ciclo do ácido cítrico, está presente em sucos de frutas cítricas e abacaxi. Apresenta-se na forma de cristais, possui sabor ácido, não possui odor e é levemente higroscópico¹³.

O ácido cítrico pode ser obtido através do processo de fermentação utilizando fungos filamentosos, leveduras e bactérias. O fungo *Aspergillus niger* é o micro-organismo utilizado para a produção industrial do ácido cítrico. Outras espécies de *Aspergillus*, tais como *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus wenti* e *Aspergillus foetidus*, e leveduras como *Saccharomycopsis lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida oleophila*, *Candida guilliermondi*, *Candida parapsilosis* e *C. citroformans* apresentam boas perspectivas de produção de ácido cítrico. Bactérias também foram estudadas; entretanto, dentre os micro-organismos, o *A. niger* apresenta-se como a melhor escolha para sua produção¹³. Na Tabela 7.1 é possível observar a produção de ácido cítrico obtida com diferentes substratos e micro-organismos.

Tabela 7.1 Produção de ácido cítrico por fermentação

| SUBSTRATO/SUPORTE | MICRO-ORGANISMO | ESTRATÉGIA | PRODUÇÃO | REFERÊNCIA |
|-------------------|-----------------|------------|-------------|------------|
| Polpa Cítrica | <i>A. niger</i> | FES | 492,7 g/kg | 14 |
| Casca de café | <i>A. niger</i> | FES | 187,54 g/kg | 15 |

| SUBSTRATO/SUORTE | MICRO-ORGANISMO | ESTRATÉGIA | PRODUÇÃO | REFERÊNCIA |
|--|------------------------------|------------|-------------|------------|
| Cachos de frutos vazios de palma (de óleo) | <i>A. niger</i> IBO – 103MNB | FES | 337,94 g/kg | 16 |
| Turfa | <i>A. niger</i> NRRL 567 | FES | 354,8 g/kg | 17 |
| Amido de batata | <i>A. niger</i> GCB-47 | FESS | 44,2 g/L | 18 |
| | <i>A. niger</i> GCMC-7 | | 71,4 g/L | |

Legenda: FES, fermentação no estado sólido; FESS, fermentação no estado semissólido.

O processo de produção do ácido cítrico ocorre normalmente por meio do uso da técnica de fermentação submersa e fermentação no estado sólido, em operação contínua e multiestágio¹³. A recuperação do ácido cítrico do caldo fermentado e sua purificação podem ser realizadas por duas principais maneiras: pela conversão do ácido cítrico em citrato de cálcio e posterior precipitação e pela técnica de extração líquido-líquido.

7.3.2 Ácido acético

O ácido acético (CH_3COOH) é um ácido fraco, transparente e com odor característico. É muito utilizado na indústria química, de detergentes, madeireira e alimentícia. O ácido acético pode ser obtido pela síntese química (carboxilação do metanol, oxidação do etileno e oxidação de alcanos) e pela conversão biológica do etanol. Apesar de o processo biológico para obtenção do ácido acético representar em torno de 10% do mercado mundial, em muitos países o ácido acético de grau alimentício deve ser produzido por processo biológico (fermentação)¹⁹.

A oxidação de etanol, o qual está presente em baixa quantidade no meio de cultivo, em ácido acético é realizada por uma cultura mista de bactérias acéticas, preferencialmente bactérias do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Várias espécies de bactérias são descritas para a produção de ácido acético, tais como *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, *A. orleanensis*, *A. lovaniensis*, *A. estunensis*, *A. malorum*, *A. cerevisiae*, *A. oeni*, *G. xylinus*, *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens*, *G. intermedius* e *G. Entanii*²⁰⁻²². Algumas produções de ácido acético por fermentação podem ser visualizadas na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 Produção de ácido acético por fermentação em meio sintético

| MICRO-ORGANISMO | ESTRATÉGIA | PRODUÇÃO | REFERÊNCIA |
|---|--|---|------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Acetobacter pasteurianus</i> | Em duas etapas: crescimento de <i>S. cerevisiae</i> e produção de etanol, e cocultura de <i>S. cerevisiae</i> e <i>A. pasteurianus</i> | 66,0 g/L | 23 |
| <i>Acetobacter aceti</i> | FSm | 53 g/L em frascos de Erlenmeyer 76 g/L em biorreator de tanque agitado | 19 |
| <i>Acetobacter aceti</i> 2096 | Batelada alimentada repetida | 90 g/L | 24 |

Legenda: FSm, fermentação submersa.

A otimização do processo biológico para a produção de ácido acético tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisas que utilizam células livres ou imobilizadas¹⁹. Wang et al. (2013)²³ estudaram um sistema de cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* e *Acetobacter pasteurianus*. No entanto, para esse tipo de cultura existe a dificuldade de os vários micro-organismos presentes possuírem diferentes condições ótimas, tais como pH, temperatura, substrato e concentrações de oxigênio.

7.3.3 Ácido láctico

O ácido láctico (CH₃-CHOHCOOH) é um ácido orgânico de ocorrência natural. Sua aplicação é versátil e ele pode ser empregado na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, de couro e química²⁵.

O ácido láctico pode ser obtido pela síntese química e por processo fermentativo. Pela rota de síntese química, uma mistura racêmica de DL-ácido láctico é produzida. Entretanto, a fermentação do ácido láctico produz o isômero puro D ou L-ácido láctico de acordo com o micro-organismo selecionado. A produção do ácido láctico pela fermentação possui outras vantagens, tais como: a utilização de substratos com baixo custo, baixas temperaturas de produção e baixo consumo de energia²⁶⁻²⁸.

O ácido láctico pode ser produzido por diversos micro-organismos, tais como bactérias, fungos filamentosos, leveduras, cianobactérias e algas. As bactérias acidoláticas são os micro-organismos mais estudados. Essas bactérias possuem características desejáveis de um micro-organismo industrial,

como habilidade de fermentar rapidamente e completamente substratos de baixo custo, requerer mínima quantidade de nitrogênio e substancias, além de propiciar altos rendimentos de um isômero específico de ácido lático sob condições de baixo pH e altas temperaturas²⁹. A produção de ácido lático utilizando diferentes micro-organismos e diferentes substratos pode ser visualizada na Tabela 7.3.

Tabela 7.3 Produção de ácido lático por fermentação

| SUBSTRATO/SUORTE | MICRO-ORGANISMO | ESTRATÉGIA | PRODUÇÃO | REFERÊNCIA |
|------------------------------------|--|---|-----------------------------|------------|
| Glicose | <i>Lactobacillus paracasei</i> | FSm em biorreator a 38 °C | 192 g/L, 96,6% do isômero L | 30 |
| Vinhaça de soja/ melaço de soja | <i>Lactobacillus agilis</i> | FSm em biorreator | 138 g/L | 31 |
| Bagaço de mandioca | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Sacarificação e fermentação simultâneas | 175,4 g/L | 32 |
| Lodo de papel | <i>Bacillus coagulans</i> | Sacarificação e fermentação simultâneas semicontínuas | 92,0 g/L | 33 |
| Melaço | <i>Lactobacillus delbrueckii mutant Uc-3</i> | FSm | 166 g/L | 34 |

Legenda: FSm, fermentação submersa.

7.3.4 Ácido fumárico

O fumarato de sódio é obtido do ácido fumárico, sendo uma molécula de quatro carbonos que contém dois grupos carboxílicos e uma dupla ligação³⁵. A produção atual é feita por síntese química do anidrido maleico, o qual provém do butano. Entretanto, com o aumento do preço do petróleo, processos fermentativos para obtenção do ácido fumárico têm recebido maior atenção^{36,37}.

Os micro-organismos que são os melhores produtores de ácido fumárico são os do gênero *Rhizopus*^{36,37}. Alguns micro-organismos produtores de ácido fumárico, assim como a produção desse ácido, estão apresentados na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 Produção de ácido fumárico por fermentação em meio sintético

| MICRO-ORGANISMO | ESTRATÉGIA | PRODUÇÃO | REFERÊNCIA |
|--|---------------------------------------|-----------|------------|
| <i>Rhizopus arrhizus</i> RH-07-13 | FSm com células imobilizadas | 32,03 g/L | 37 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> FM19 | FSm | 56,50 g/L | 38 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> Wild1.22 (mutante) | FSm | 49,40 g/L | 39 |
| <i>Rhizopus delemar</i> NRRL1526 | FSm em biorreator tipo tanque agitado | 35,42 g/L | 40 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> ME-F12 mutante | FSm em biorreator tipo tanque agitado | 42,50 g/L | 41 |

Legenda: FSm, fermentação submersa.

O mecanismo de biossíntese do ácido fumárico, apesar de muito estudado, ainda não foi totalmente elucidado, o que tem sido um gargalo para o melhoramento do processo de produção e sua industrialização. Dessa forma, muita atenção tem sido dada à investigação sobre a produção, condições de cultivo e sua influência no rendimento de ácido fumárico³⁸.

7.4 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes desempenham uma função vital tanto nos alimentos quanto na saúde humana reduzindo os processos oxidativos. Em sistemas alimentares, os antioxidantes são úteis no retardamento da peroxidação lipídica e na formação de produtos de peroxidação secundária de lipídios, e, assim, ajudam a manter o sabor, aroma, textura, e, em alguns casos, a cor do alimento durante o armazenamento⁴².

De acordo com DeMan (1999)⁴³ algumas vezes os antioxidantes são incorporados na embalagem dos alimentos, e não no alimento em si. Nesses casos, é permitida uma quantidade maior de antioxidantes.

Antioxidantes alimentares são todas as substâncias que possuem o efeito de retardar ou prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos. Os antioxidantes são um grupo heterogêneo e diversificado de compostos com diferentes mecanismos de ação. Dentre os mais conhecidos estão vitaminas, minerais, pigmentos, enzimas e diferentes compostos vegetais.

7.4.1 Classes de antioxidantes

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. O mais amplamente utilizado é a vitamina C e substâncias relacionadas, como o ácido eritórbito. Dentre os agentes quelantes, o mais utilizado é o ácido cítrico. Tais agentes quelantes removem íons metálicos, que são poderosos agentes oxidativos.

Os antioxidantes primários finalizam os radicais livres, funcionando como doadores de elétrons. Dentre esses antioxidantes estão inclusos os tocoferóis, os antioxidantes fenólicos e também os antioxidantes sintéticos hidroxitolueno butilato (BHT) e hidroxianisol butilato (BHA). Os antioxidantes enzimáticos como a glicose oxidase possuem a capacidade de remover oxigênio dissolvido ou no *headspace*. Dentre os antioxidantes sinergistas destacam-se as lecitinas. Os antioxidantes sinergistas possuem pouca ou nenhuma atividade antioxidativa, porém possuem a capacidade de aprimorar a atividade de outros antioxidantes.

7.4.1.1 Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido L-ascórbico foi produzido industrialmente há cerca de 70 anos. Nas últimas duas décadas, vários sistemas inovadores de bioconversão foram propostos a fim de simplificar o método de síntese química chamado método de Reichstein⁴⁴. Embora os processos biotecnológicos já sejam explorados para a produção de vitamina C, o método químico ainda é o mais utilizado. Sauer et al. (2004)⁴⁵ produziram vitamina C com *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii* por fermentação submersa. De acordo com Bremus et al. (2005)⁴⁴ uma crescente demanda e competição em todo o mundo são a força motriz para o desenvolvimento de métodos alternativos de produção de ácido L-ascórbico⁴⁴.

O ácido L-ascórbico é produzido industrialmente a partir de glicose. O açúcar é primeiramente reduzido a sorbitol e então oxidado a L-sorbose pelo *Acetobacter suboxydans*, posteriormente resultando em um composto chamado ácido 2-ceto-gulônico. Este é oxidado a um derivado do ácido 2-L-oxogulônico. Após a remoção dos grupos isopropilidênicos, o ácido L-ascórbico é obtido tendo o ácido oxogulônico como intermediário. Essa síntese pode ser encurtada e ter seus custos reduzidos com a utilização de

uma bactéria geneticamente modificada de *Erwinia herbicola*, a qual converte diretamente a D-glicose em ácido L-oxogulônico⁴⁶.

Diante da necessidade de preservar a vitamina C como componente de alimentos, o D isômero do ácido isoascórbico (ácido eritórbito) é incorporado ao ácido ascórbico. Esse composto não possui propriedades de vitamina, porém é oxidado mais rapidamente do que o ácido ascórbico, protegendo-o da degradação. O ácido eritórbito pode ser sintetizado quimicamente, ou sintetizado por fermentação da sacarose por *Penicillium* ou da glicose por *Pseudomonas* seguido por reações de esterificação.

7.4.1.2 Tocoferol (Vitamina E)

Vitamina E é o nome popular para todos os compostos que apresentam atividade biológica do α -tocoferol. De acordo com Branen (2002)⁴⁷, tocoferóis são os antioxidantes de quebra de cadeia mais ativos. A principal fonte desses compostos são os vegetais; sendo assim, ocorrem na maioria dos alimentos, a menos que sejam removidos por meio de processos específicos durante a fabricação.

A maior parte dos tocoferóis comerciais é obtida por extração vegetal. De acordo com o Institute of Medicine (2000)⁴⁸, as vitaminas obtidas por vias sintéticas são geralmente idênticas às naturais e possuem as mesmas funções, porém essa relação não é verdadeira para a vitamina E, devido às suas diferentes configurações moleculares, afetando seu funcionamento.

Diversos estudos reportam a produção de tocoferóis por vias fermentativas, principalmente α -tocoferol. Ogbonna, Tomiyama e Tanaka (1999)⁴⁹ obtiveram produção de α -tocoferol através da alga verde *Euglena gracilis* em um processo com alimentação heterotrófica e fotoautotrófica. Durmaz (2007)⁵⁰ estudou o acúmulo do composto a partir da alga marinha *Nannochloropsis oculata*, limitando o nitrogênio.

7.4.1.3 Lecitinas

As lecitinas são indiscutivelmente os mais difundidos dos fosfolipídios na natureza e estão contidos em praticamente todas as células vivas. Estão presentes em muitos produtos alimentares, tais como gema de ovo, vários tipos diferentes de chocolate e, principalmente, em farinha de soja⁵¹. Em sua

composição as lecitinas possuem fosfolipídios, glicolipídios e carboidratos complexos.

As lecitinas trazem grandes benefícios à saúde e têm importantes aplicações industriais como agente emulsionante comestível, antioxidante, agente dispersante, estabilizante, desmoldante, umectante e inibidor de cristalização. Apesar de não existirem trabalhos buscando a produção biotecnológica de lecitina, a hidrólise enzimática e microbiana é utilizada para melhorá-la ou modificar seus fosfolipídios⁵²⁻⁵⁴.

7.4.1.4 Flavonoides

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres. Os compostos fenólicos mais estudados e já produzidos por via biotecnológica são ácido cafeico⁵⁵, ácido gálico⁵⁶ e ácido elágico⁵⁷. Esses compostos de considerável importância na dieta podem inibir o processo de peroxidação lipídica⁵⁸.

7.5 AROMAS

Segundo a International Organization of Flavor Industry (IOFI)⁵⁹, aromatizante é uma preparação concentrada, adicionada ou não de solventes ou veículos, utilizada para transmitir sabor, com exceção do sabor somente doce, azedo ou salgado. Já a ANVISA define aromatizantes como substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos. Excluem-se dessa definição os produtos que conferem exclusivamente sabor doce, salgado ou ácido e as substâncias alimentícias ou produtos normalmente consumidos como tal, com ou sem reconstituição, conforme a Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999⁶⁰.

Os aromatizantes são aditivos tão importantes quanto os macronutrientes (proteínas, gorduras e carboidratos) e micronutrientes (vitaminas e minerais), podendo ser considerados como componentes essenciais para a alimentação humana e animal, já que conferem odor e sabor agradável aos alimentos industrializados.

Os aromatizantes/aromas classificam-se em naturais ou sintéticos. Sendo que os naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas de origem animal ou vegetal, normalmente utilizadas na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, tratamento enzimático etc.). Incluem-se nos aromatizantes ou aromas naturais os óleos essenciais e extratos (líquidos ou secos). Os aromatizantes ou aromas sintéticos são compostos obtidos por processos químicos. Os aromas idênticos aos naturais são substâncias quimicamente obtidas por síntese ou substâncias isoladas por processos químicos a partir de matérias-primas de origem animal ou vegetal, que apresentam uma estrutura química idêntica à das substâncias presentes nas referidas matérias-primas naturais (processadas ou não). Os aromas artificiais são compostos químicos obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal ou vegetal, utilizados por suas propriedades aromáticas, em seu estado primário ou preparados para o consumo humano.

A indústria de alimentos e bebidas tem utilizado combinações de ésteres, como acetato de etila, acetato de isoamila, isobutirato de etila, acetato de propila e outros, para intensificar aromas em sorvetes, doces, sucos artificiais e néctares de frutas, e até mesmo fornecer sabor suave a “*drinks*” industrializados. Já a indústria farmacêutica tem utilizado esses compostos de aroma para mascarar sabor desagradável de medicamentos. O caráter hidrofóbico desses compostos dificulta sua incorporação; nesse sentido, novas formulações têm sido propostas para facilitar o uso de ésteres em alimentos. Edris e Malone (2011)⁶¹ desenvolveram uma formulação de éster (aroma de banana) a base de água por microemulsão para aromatizar aplicações que utilizam laurato de sacarose como surfactante. Kim et al. (2014)⁶² testaram cinco compostos voláteis com diferentes hidrofobicidades e grupos funcionais (benzaldeído, citral, mentol, diacetil e acetato de isoamila) para medir sua liberação em gel de pectina, sendo que géis com alto teor de cálcio e pectina reduziram a intensidade percebida dos aromas, bem como sua liberação.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA), o faturamento do setor de alimentos em 2012 foi de 431,9 bilhões de reais⁶³. O mercado de aromas corresponde a 25% do mercado de aditivos para alimentos. Devido à grande evolução no mercado de alimentos processados industrializados, aumentou a utilização de compostos de origem natural, os quais são mais valorizados quando se refere à saúde humana. O aumento na demanda por produtos naturais tem estimulado as pesquisas

e o desenvolvimento de aromas produzidos tanto por fermentação quanto por reação enzimática. Os estudos relatam o desenvolvimento de aromas de aplicação em bebidas como vinhos, cafés, qualidade de queijos entre outros alimentos. Segundo Mantzouridou e Paraskevopoulou (2012)⁶⁵, os compostos aromatizantes mais importantes são os ésteres voláteis, que, quando em misturas ou separadamente, conferem odor frutal aos alimentos e bebidas. A Tabela 7.5 apresenta alguns estudos desenvolvidos na produção de aromas naturais por via biotecnológica.

Tabela 7.5 Estudos recentes envolvendo aromas naturais produzidos por via biotecnológica

| SUBSTRATO | BIOPROCESSO | ENZIMA | MICRO-ORGANISMO | PRODUTOS | REFERÊNCIA |
|---|--|---------------------------------------|---|---|------------|
| Mosto de uvas de <i>Vitis vinifera</i> cv | Influência de fungicidas na síntese de aromas no processo de produção do vinho Tempranillo | Álcool acetiltransferase e acetil-CoA | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Redução do aroma frontal no vinho | 66 |
| Mosto de uvas de <i>Vitis vinifera</i> | Síntese enzimática favorecendo aroma do vinho | Poligalacturonase | <i>Pichia pastoris</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> | α -pineno, limoleno, eugenol, citrionelol, terpineol | 67 |
| Soja | Estudo dos aromas produzidos durante fermentação | | <i>R. oligosporus</i> , NRRL 2710 | Tempeh | 68 |
| Leite de coco | Síntese enzimática de ésteres de açúcares e sua estabilidade em emulsão de leite de coco | Lipase imobilizada | <i>Candida antarctica</i> tipo B | Ésteres de sacarose, frutose e lactose | 69 |

Rossi et al. (2009)⁶⁴, otimizaram a produção de aroma natural por fermentação no estado sólido pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* utilizando a polpa cítrica, subproduto da agroindústria, como substrato. As melhores condições para obtenção do aroma foram: a complementação da polpa cítrica com 50% de farelo de soja, 25% melaço de cana e solução salina, sendo pH ideal 6,0, umidade inicial de 75%, taxa de inóculo de 10^7 esporos/g de substrato. Os compostos de aromas produzidos durante 120 horas de fermentação foram acetaldeído, etanol, acetato de etila, acetato de propila, isobutirato de etila, 2-hexanona, 2-hexanol e o de maior impacto no aroma global de banana, acetato de isoamila. Cvjetko, Vorkapic-Furac e Znidarsic-Plazl (2012)⁷⁰, desenvolveram a biosíntese de acetato de isoamila utilizando a enzima lipase imobilizada de *Candida antarctica* B, esta catalizou

a reação de acilação de álcool isoamílico e anidrido acético em líquidos iônicos baseados em cátions imidazólicos quaternários de cátions.

7.6 CONSERVANTES

O uso de conservantes é necessário em alimentos que não podem ser submetidos a processos físicos e/ou biológicos de conservação de forma a preservá-los. Os conservantes químicos são de especial importância em países tropicais, onde a deterioração de alguns alimentos é acentuada pelo grau de umidade e temperaturas próximas ao ótimo do desenvolvimento microbiano⁷¹.

De acordo com o Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965, conservante é toda substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por micro-organismos ou enzimas. A ação antimicrobiana dos conservantes baseia-se em efeitos sobre um ou mais componentes/atividades, tais como: ácido desoxirribonucleico (DNA), membrana plasmática, parede celular, síntese proteica, atividade enzimática e transporte de nutrientes. A escolha adequada de um conservante deve ser feita com base em alguns fatores, tais como o tipo de micro-organismo a ser inibido, facilidade de manuseio, impacto no paladar, custo e eficácia⁷¹.

7.6.1 Ácido propiônico

O principal conservante produzido por via biotecnológica é o ácido propiônico. A produção de ácido propiônico por fermentação, como uma alternativa para a síntese química, utiliza *Propionibacteria* usualmente. Esses micro-organismos são capazes de crescer e produzir ácido propiônico utilizando como substrato um número extenso de subprodutos agrícolas e industriais⁷². A Tabela 7.6 apresenta alguns trabalhos nesse sentido.

Tabela 7.6 Produção de ácido propiônico por fermentação

| MICRO-ORGANISMO | ESTRATÉGIA | PRODUÇÃO | REFERÊNCIA |
|--|---|-----------|------------|
| <i>Propionibacterium acidipropionici</i> | Fermentação em <i>shaker</i> em condição de anaerobiose | 14,38 g/L | 73 |
| <i>Propionibacterium freudenreichii</i> | Biorreator de adsorção em leito expandido | 52,5 g/L | 74 |
| <i>Propionibacterium acidipropionici</i> | Fermentação sequencial | 50,8 g/L | 72 |

7.7 CORANTES E PIGMENTOS

A indústria alimentícia e farmacêutica utiliza corantes na maioria de seus produtos. A cor é em geral a primeira característica organoléptica notada em um objeto, sendo uma percepção sensorial muito forte, antecedendo a percepção de odor e de textura do produto.

O uso de corantes naturais é regulamentado por agências como a ANVISA (no Brasil), a Food and Drug Administration (FDA, nos Estados Unidos) e sugerida pelo Codex Alimentarius (Organização das Nações Unidas – ONU). Embora o uso de corantes às vezes seja abusivo, há diversas razões técnicas e justificáveis para seu emprego, por exemplo, a padronização de lotes diferentes de um produto, a “reposição” de cor perdida durante processamento, a melhoria de aspecto de um produto^{75,76} etc.

A rigor, na indústria, substâncias com cor que são solúveis são chamadas corantes, enquanto as insolúveis são chamadas de pigmentos. No entanto, as substâncias coloridas produzidas por plantas são chamadas em biologia de pigmentos, e esse termo acabou sendo mais usado na pesquisa internacional de corantes naturais produzidos por bioprocessos – daí o termo “biopigmentos”.

Os pigmentos produzidos por micro-organismos e utilizados comercialmente são a riboflavina, pigmentos de *Monascus*, carotenoides, astaxantina e ficocianina, principalmente em países orientais. Esses pigmentos representam cerca de 25% do mercado global de pigmentos naturais⁷⁷, que é estimado em mais de 600 milhões de dólares e continua em crescimento⁷⁸. Há um incremento constante do mercado global para pigmentos, devido tanto à expansão moderada da economia quanto ao aumento populacional. Projeta-se um mercado global de pigmentos naturais de mais de 1,5 bilhões de dólares para 2020⁷⁷, incluindo os corantes extraídos de vegetais e biomassas coloridas usadas na alimentação de peixes e aves.

7.7.1 Produção por micro-organismos

Biopigmentos podem ser acumulados intracelularmente ou ser excretados, dependendo da função da molécula no micro-organismo. A Tabela 7.7 mostra alguns micro-organismos produtores de pigmentos mais importantes comercialmente.

Tabela 7.7 Pigmentos microbianos cuja produção existe em escala comercial

| MICRO-ORGANISMO | PIGMENTO | COR | CONCENTRAÇÃO TÍPICA | REFERÊNCIA |
|--|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------|
| <i>Dunaliella salina</i> | β -caroteno | Vermelho-alaranjado | 14 mg/g | 79 |
| <i>Phaffia rhodozyma</i> | Astaxantina | Salmão | 0,35 mg/g | 80 |
| <i>Blakeslea trispora</i> | β -caroteno | Vermelho-alaranjado | 40-170 mg/g biomassa, em FSm | 81, 82 |
| <i>Monascus sp.</i> | Mistura de azafilonas | Vermelha, laranja, amarelo | 0,3-2,5 mg/g substrato, em FES | 83, 84 |
| Diversas microalgas, como <i>Chlorella</i> e <i>Spirulina</i> | Clorofila | Verde | 11,6 mg/g | 85 |

Legenda: FES, fermentação no estado sólido. FSm, fermentação submersa

Quando se trabalha com pigmentos produzidos em biorreatores, através do cultivo de micro-organismos ou células, a produtividade é potencialmente muito maior que aquela obtida em produção vegetal, principalmente devido ao baixo tempo de duplicação de micro-organismos e à facilidade de processamento do material bruto⁸⁶. Além do ciclo de produção ser mais curto, a concentração em micro-organismos é geralmente mais alta que em plantas. Por exemplo, para a produção de β -caroteno, podem-se usar cenouras; com um ciclo de produção de 100 dias e uma concentração final de 70 mg/kg do carotenoide; agrião, com um ciclo de produção de cerca de 60 dias e uma concentração de 60 mg/kg de carotenoide; ou um fungo, com ciclo de produção de 5 dias e concentração final de 250 mg/kg de carotenoide⁷⁷.

A produção de biopigmentos intracelulares consiste no cultivo do micro-organismo em meio de cultivo adequado, seguido de separação de biomassa. Os meios de cultivo para cada espécie são abundantes na literatura; como as moléculas de interesse não são metabólitos primários, em geral convém usar um meio de cultivo adequado para a produção de biomassa, seguido de uma etapa de indução da produção de pigmentos. A biomassa pode ser separada por filtração ou centrifugação, e o produto pode ser a própria biomassa (caso em que é feita apenas a secagem e moagem do material); caso o pigmento seja intracelular ou se deseje uma formulação concentrada, o pigmento pode ser extraído e parcialmente purificado antes da formulação (Figura 7.1). Não é usualmente necessário purificar o pigmento para além de uma adsorção e filtração de precipitados.

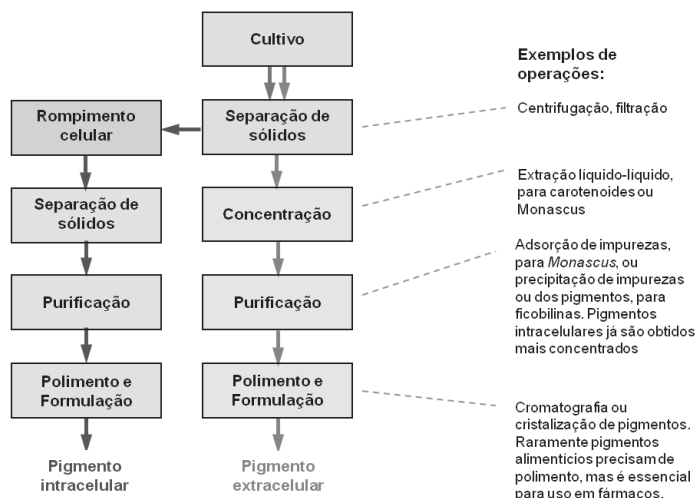


Figura 7.1 Processos envolvidos em produção de pigmentos microbianos.

7.7.2 Formulação e aplicação

Para serem usados em alimentos, pigmentos naturais podem ser adicionados como ingrediente (como biomassa concentrada ou parcialmente purificada, por exemplo) ou como aditivos. Nesse segundo caso, a formulação do pigmento como uma dispersão solúvel pode ser necessária. As formulações típicas de corantes são hidrossolúveis ou lipossolúveis; a forma de preparar uma dessas formulações dependerá da estrutura química do pigmento.

No caso de pigmentos lipossolúveis como carotenoides, a formulação lipossolúvel é uma simples solução (em óleo), enquanto a hidrossolúvel pode ser uma emulsão óleo-água e exige, portanto, a adição de um estabilizante como lecitina. No caso de um pigmento hidrossolúvel como a clorofilina cúprica, a sua formulação lipossolúvel é que precisa de emulsificante, enquanto a formulação hidrossolúvel é uma solução aquosa. A quantidade de pigmentos naturais permitida em alimentos é, de forma geral, *ad quantum satis*, de acordo com as boas práticas de fabricação de alimentos.

A legislação restringe o uso de novos pigmentos, a não ser que sejam moléculas derivadas de micro-organismos genericamente reconhecidos como seguros (GRAS). Portanto é necessário realizar testes toxicológicos com o micro-organismo e com a molécula, a fim de avaliar a segurança de uso do pigmento. Além das estratégias tradicionais de produção, o uso de

micro-organismos modificados que expressem pigmentos já conhecidos de plantas deve ser uma fonte de novos produtos nos próximos anos⁷⁷.

7.8 ESPESSANTES

As substâncias químicas que são capazes de aumentar nos alimentos a viscosidade de soluções, de emulsões e de suspensões são conhecidas como espessantes. São utilizadas para dispersar, estabilizar ou evitar a sedimentação de substâncias em suspensão⁸⁷.

7.8.1 Goma xantana

A goma xantana é o biopolímero mais conhecido e estudado. Composto por glicose, é produzido comercialmente por fermentação. É um heteropolissacarídeo secretado por bactérias do gênero *Xanthomonas* (Tabela 7.8). Possui elevado interesse industrial, principalmente para as indústrias de alimentos, farmacêutica e de petróleo devido às suas propriedades físico-químicas, que superam todas as dos outros polissacarídeos disponíveis no mercado, tais como elevada viscosidade em baixas concentrações, bem como sua estabilidade em ampla faixa de temperatura e de pH, mesmo na presença de sais^{88,89}.

Tabela 7.8 Produção de goma xantana

| SUBSTRATO/ SUPORTE | MICRO-ORGANISMO | ESTRATÉGIA | PRODUÇÃO | REFERÊNCIA |
|---------------------------|--|--------------------------------|-----------|------------|
| Melaço de beterraba | <i>Xanthomonas campestris</i> | F _{Sm} e cepa mutante | 28 g/L | 90 |
| Produtos do suco da palma | <i>Xanthomonas campestris</i> NRRL B-1459 | F _{Sm} | 43,35 g/L | 91 |
| Soro de queijo e sacarose | <i>Xanthomonas campestris</i> | F _{Sm} | 25 g/L | 92 |

Legenda: F_{Sm}, fermentação submersa.

Vários fatores afetam a produção de goma xantana, obtendo-se assim uma variação nos rendimentos e na qualidade do polímero. As variáveis que influenciam na produção são a composição do meio de cultivo, da linhagem

e das condições de fermentação utilizadas (temperatura, pH, velocidade de agitação, concentração inicial de nitrogênio)⁹³.

7.8.2 Goma gelana

A goma gelana é um polissacarídeo extracelular composto por glicose, ácido glicurônico e resíduos de ramnoses. Devido à sua estrutura e propriedades, a goma gelana possui aplicações em alimentos, indústria farmacêutica e outras indústrias. A goma gelana é produzida por fermentação por *Sphingomonas paucimobilis*⁹⁴⁻⁹⁶. Diferentes produções de goma gelana são listadas na Tabela 7.9.

Tabela 7.9 Produções de goma gelana

| SUBSTRATO/ SUPORTE | MICRO-ORGANISMO | ESTRATÉGIA | PRODUÇÃO | REFERÊNCIA |
|--------------------|---|--------------------------|----------|------------|
| Amido solúvel | <i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 31461 | FSm | 43,6 g/L | 95 |
| Bagaço de soja | <i>Sphingomonas paucimobilis</i> NK 2000 | FSm em Biorreator de 7 L | 7,5 g/L | 94 |
| Amido solúvel | <i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 31461 | FSm | 35,7 g/L | 96 |

Legenda: FSm, fermentação submersa.

7.8.3 Goma curdlana

A goma curdlana, um polímero de glicose com ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 3), é um polissacarídeo neutro, insolúvel em água e de cadeia linear. Este biopolímero é um espessante com propriedades de gelificação térmica diferenciadas e é amplamente utilizado na indústria alimentar, possuindo aplicações farmacêuticas^{97,98}.

Esse polissacarídeo é produzido industrialmente por fermentação e, em quantidade, perde somente das gomas xantana e gelana. Pode ser produzido por bactérias como *Rhizobium radiobacter*, espécies de *Agrobacterium* e *Alcaligenes faecalis* sob condição de nitrogênio limitado^{97,98}. Salah et al. (2011)⁹⁷ produziram curdlana utilizando hidrolisado de palma e a bactéria *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466, sendo que a concentração de curdlana

obtida foi de 22,83 g/L. Um estudo sobre o efeito da fonte de nitrogênio na produção de curdlana foi feito por Jiang (2013)⁹⁸, utilizando *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749. Nesse estudo, a máxima produção obtida de curdlana foi de 28,16 g/L.

7.8.4 Alginato

O alginato é amplamente utilizado como espessante, estabilizador, gelificante e emulsificante nas indústrias de alimentos, têxteis, farmacêuticas e fabricação de papel. O alginato é um copolímero linear formado por ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4^{99,100}.

O alginato comercial atualmente é extraído de algas tais como a *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* e *Macrocystis pyrifera*. Entretanto, micro-organismos como *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas aeruginosa* produzem alginato. A sua produção por micro-organismos pode permitir uma exploração controlada de fontes naturais, e a produção pode ser realizada sob condições controladas, usando substratos de qualidade constante e permitindo assim a obtenção de materiais específicos com características uniformes⁹⁹⁻¹⁰².

7.9 REALÇADORES DE SABOR

Há compostos que intensificam o aroma de um gênero alimentício, apesar de não possuírem odor ou gosto (*flavor*) nas concentrações utilizadas. Os efeitos dos realçadores de sabor referem-se às sensações de frescor, volume, consistência, sensibilidade e velocidade de percepção¹⁰³. Os realçadores de sabor são amplamente utilizados em diversos produtos industrializados, como sopas, salgadinhos, batatas fritas, macarrões, temperos e comidas congeladas, além de estarem presentes naturalmente em diversos produtos de origem vegetal e também em produtos de origem animal, como carne, queijo e leite.

Os realçadores de sabor se dividem basicamente em dois grandes grupos: os glutamatos e os diferentes derivados dos 5'-nucleotídeos¹⁰⁴.

7.9.1 Glutamato monossódico

O glutamato monossódico (MSG) é o mais utilizado e conhecido realçador de sabor. Descoberto em 1908 pelo pesquisador japonês Kikunae Ikeda, o MSG, como é conhecido, tem um gosto que não é explicado pela combinação de nenhum dos sabores já existentes, assumindo-se então, já comprovadamente, a existência do quinto sabor, o umami.

O primeiro processo industrial de produção de MSG fundamentava-se em um método de extração no qual as proteínas vegetais eram tratadas com ácido hidrocloreídrico para romper as cadeias peptídicas. O ácido L-glutâmico era então isolado desse material e purificado como MSG. Devido às muitas desvantagens inerentes a esse método, a produção inicial de MSG era limitada. Apenas em 1956 um método fermentativo de produção foi desenvolvido¹⁰⁵. Como vantagens da produção biotecnológica pode-se citar a redução dos custos de produção e da poluição ambiental.

Segundo a FDA, o glutamato monossódico é reconhecido como seguro (GRAS). Outros comitês internacionais, como o Comitê Científico Europeu para Alimentos, a ANVISA e a Associação Médica Americana, também consideraram o MSG e outros realçadores de sabor seguros.

Atualmente, a maior parte do MSG comercial é produzida por processo fermentativo. De acordo com Sano (2009)¹⁰⁵, a produção total mundial de MSG por fermentação é estimada em 2 milhões de toneladas/ano.

A maioria das bactérias produtoras de ácido glutâmico são gram-positivas em forma não esporulada, sem motilidade, e requerem biotina para crescer. Essas bactérias podem utilizar diversas fontes de carbono para crescer como glucose, sacarose, maltose, ribose e xilose. Para produção industrial, diversos substratos são utilizados, como amido de tapioca, melaço de cana e melaço de beterraba.

7.9.2 5 Nucleotídeos

Os nucleotídeos utilizados como realçadores de sabor incluem os diferentes sais de inosina monofosfato 5' (IMP), adenosina monofosfato (AMP), guanosina monofosfato 5' (GMP) e xanilato monofosfato (XMP). O AMP encontrado em vegetais, crustáceos e moluscos, o IMP em carne e peixe, o GMP em cogumelos, especialmente no *shiitake*. A intensidade dos realçadores de sabor e suas concentrações estão diretamente relacionadas. Além de os nucleotídeos terem efeito superior ao MSG nas mesmas concentrações,

eles possuem um forte efeito sinérgico juntos; dessa forma, a mesma concentração de ambos misturados possui um efeito 16 vezes maior que o MSG utilizado isoladamente. Uma vez que baixas concentrações desses realçadores são suficientes para dar sabor, esses produtos são benéficos para pessoas que não podem ingerir grandes quantidades de sal.

A produção industrial de IMP e GMP é alcançada principalmente através da quebra do ácido ribonucleico (RNA) e extração de nucleotídeos ou por fermentação microbiana utilizando diferentes micro-organismos, como *Corynebacterium* e *Escherichia coli*¹⁰⁶.

7.9.3 Maltol

O maltol é um composto que não se enquadra nem nos glutamatos nem nos aminoácidos. De acordo com DeMan (1999)⁴³, ele aumenta a percepção da doçura em alimentos ricos em carboidratos como sucos e geleias. Esse composto possui um odor caramelizado e é permitido pela FDA, sendo liberado pela ANVISA como aromatizante (Consulta Pública nº 86, Decreto nº 3.029, 2005)¹⁰⁷. O maltol pode ser produzido pelo aquecimento da maltose (açúcar do malte) e lactose (açúcar do leite), e também é produzido por processos fermentativos por micro-organismos obtidos a partir da tecnologia do DNA recombinante.

7.9.4 Acesulfame de potássio e aspartame

Conhecidos popularmente pela utilização como adoçantes, esses dois edulcorantes também possuem função como realçadores de sabor em gomas de mascar. O adoçante aspartame (éster metílico da L- α -aspartil-L-fenilalanina) é produzido em escala de quilotoneladas pela Holland Sweetner Company, uma *joint venture* formada pela Tosoh e DSM. O processo de produção do aspartame utiliza uma enzima proteolítica, a termolisina, para catalisar a formação de um dipeptídeo derivado do ácido L-aspártico N-protetido e do éster metílico da DL-fenilalanina¹⁰⁸. O ácido L-aspártico também é obtido por biocatálise promovida por uma aspartase que catalisa a adição de amônia ao ácido fumárico¹⁰⁸.

7.10 SURFACTANTES

A palavra surfactante vem da expressão “*surface active agent*”, significando “agente de atividade superficial”. Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos, são comercializados na maioria dos países industrializados na forma sintética de derivados do petróleo. Estes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais como petróleo, petroquímico, alimentos, bebidas, cosméticos, farmacêutico, mineração, metalúrgico, agroquímico, fertilizantes, ambiental como biorremediação de solos e indústria de papel e celulose. Devido à sua atividade tensoativa, os surfactantes apresentam importantes propriedades, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases.

Conforme Barros, Quadros e Pastore (2008)¹⁰⁹, os biossurfactantes são compostos com a mesma atividade tensoativa dos surfactantes, porém são de origem natural, já que são produzidos por várias espécies de micro-organismos. Esses compostos compreendem uma grande diversidade de moléculas quimicamente diferentes como glicolipídios, lipossacarídeos, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros, lipopeptídios. Segundo Nitschke e Pastore (2002)¹¹⁰ os glicolipídios podem ser produzidos por: *Pseudomonas aeruginosa*, *Torulopsis bombicola*, *T. apícola*, *Rhodococcus erythropolis* e *Mycobacterium sp.*; os lipopeptídios e lipoproteínas, por *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis* e *Bacillus polymyxa*; os ácidos graxos, por *Corynebacterium lepus*; os lipídios neutros, por *Nocardia erythropolis*; os fosfolipídios produzidos por *Thiobacillus thiooxidans*; os surfactantes poliméricos por *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida tropicalis* e os biossurfactantes particulados produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus*.

O uso de técnicas como do DNA recombinante também podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos biológicos de baixo custo e elevado rendimento para a indústria, como o processo de produção de surfactantes. Dwyer et al. (2014)¹¹¹, demonstrou que a bactéria *E.coli* geneticamente modificada foi capaz de produzir 4,8 mg de proteína surfactante recombinante com rendimento de 84% após a microfiltração simples. A Tabela 7.10 apresenta alguns estudos de produção de biossurfactantes.

Tabela 7.10 Produção de biossurfactantes utilizando diferentes substratos/suportes

| SUBSTRATO/ SUPORTE | MICRO-ORGANISMO | ESTUDO BIOPROCESSO | PRODUTO | REFERÊNCIA |
|---|------------------------------------|---|--------------------------------|------------|
| Meio basal salina | <i>Oceanobacillus sp.</i> BRI 10 | Estudo de biossurfactantes isolados de micro-organismos da água do Oceano Atlântico | Biossurfactante | 112 |
| Suco de caju clarificado | <i>Bacillus subtilis</i> LAM 005 | Estudo cinético de biossurfactante produzidos por FSm | Biossurfactante semipurificado | 113 |
| Okara (resíduo da produção do leite de soja) Bagaço de cana | <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 | FES | Surfactina | 114 |
| Manipueira pré-tratada | <i>Bacillus subtilis</i> LB5a | Estudo das propriedades emulsificantes e estabilidade de biossurfactante produzidos por FSm | Biossurfactante semipurificado | 109 |

Legenda: FES, fermentação no estado sólido; FSm, fermentação submersa.

A grande vantagem dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintetizados quimicamente é que os naturais possuem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, além de suportarem extremos de temperatura, pH e salinidade. De maneira geral, há uma tendência ao uso de biossurfactantes em substituição aos surfactantes de origem petroquímica (sintéticos), como alquil benzenos ramificados, que podem ocasionar problemas ambientais.

7.11 CONCLUSÕES

Intensa pesquisa vem sendo conduzida nas últimas décadas na busca de soluções biotecnológicas com vistas à produção de bioprodutos de interesse comercial. Os aditivos químicos vêm sendo aos poucos substituídos pelos aditivos biológicos e naturais, que obtêm cada vez mais espaço no mercado mundial. Destacam-se os aminoácidos como o glutâmico, os ácidos orgânicos e as gomas cuja produção por via biotecnológica tem aumentado significativamente nos últimos anos. O desenvolvimento de novas técnicas e a utilização de matérias-primas mais baratas (como os resíduos e subprodutos agrícolas e agroindústrias) têm consolidado as tecnologias de produção desses bioaditivos cuja demanda vem crescendo de forma global.

7.12 PERSPECTIVAS FUTURAS

Mesmo que os bioaditivos sejam produtos que já atingiram uma ampla escala de aplicação biotecnológica, recentes inovações tecnológicas como recombinação genética, fusão celular, nanotecnologia e desenvolvimento de biorreatores vêm sendo pesquisadas e aplicadas na melhoria de sua produtividade em escala industrial. Em função desse potencial comercial, a indústria brasileira poderá ter grandes benefícios, pois dispõe de grande abundância de matérias-primas de resíduos agroindústrias, fundamentais para a produção de bioaditivos de forma competitiva com demais países produtores.

REFERÊNCIAS

1. Krzyczkowska J, Bialecka-Florjanczyk E, et al. Biotechnological Methods for Producing Odoriferous Substances. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc.* 2009;16(3):5-18.
2. Anprung P, Charoensiddhi S. Characterization of Bael Fruit (*Aegle Marmelos* [L.] Correa) Hydrolysate as Affected by Enzyme Treatment. *Journal of Food Biochemistry.* 2010;34(6):1249-67.
3. Copikova J, Uher M, et al. Natural colorant. *Chemicke Listy.* 2005;99(11):802-16.
4. Global Information Inc. [Internet]. Premium Market Research Reports. Global Information Inc. [Cited 2013 Nov 18] Available from: <http://www.prnewswire.com/news-releases>. English.
5. ANVISA. Regulamentação de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia no Brasil. Portaria n. 540, 27 oct 1997.
6. Soccol CR, Pandey A, Larroche C. Fermentation Processes Engineering in the Food Industry. Boca Raton: CRC Press; 2013. 510 p.
7. ANVISA. Lei do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Lei n. 9782, 26 jan 1999.
8. ANVISA. Registro e Dispensa de Registros em Alimentos. RDC n. 27/2010.
9. Gava AJ. Princípios de tecnologia de alimentos. São Paulo: NBL Editora; 1978. 284 p.
10. Branen AL, Davidson PM, Salminen S, Thorngate J. Food Additives. Boca Raton: CRC Press; 2001. 952 p.
11. Lewis RJ. Food Additives Handbook. New York: Van Nostrand Reinhold; 1989. 592 p.
12. Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. Tecnologia de alimentos. São Paulo: NBL Editora; 2009. 511 p.
13. Angumeenal AR, Venkappayya D. An overview of citric acid production. *LWT – Food Science and Technology.* 2013;50:367-70.
14. Rodrigues C, Vandenberghe LPS, Sturm W, Dergint DEA, Spier MR, Carvalho JC, Soccol CR. Effect of forced aeration on citric acid production by *Aspergillus* sp. mutants in SSF. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29(12):2317-24.
15. Ramachandra YL, Narayanamurthy G, Jois S, Chavan A, Satwadi PR. Production of Citric Acid in Basal Coffee Husk Medium by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation. *Advances in Biological Research.* 2013;7(6):234-40.
16. Bari MD, Alam, MZ, Muyibi SA, Jamal P, Al-Mamun A. Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: Optimization of media by statistical experimental designs. *Bioresource Technology.* 2009;100:3113-20.
17. Barrington S, Kim JW. Response surface optimization of medium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. *Bioresource Technology.* 2008;99:368-77.

18. Haq IU, Ali S, Iqbal J. Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. 2003;38:921-4.
19. Awad HM, Diaz R, Malek RA, Othman NZ, Aziz RA, El Enshasy HA. Efficient Production Process for Food Grade Acetic Acid by *Acetobacter aceti* in Shake Flask and in Bioreactor Cultures. *E-Journal of Chemistry*. 2012;9(4):2275-86.
20. Adams MR. Vinegar. In: Wood JB, editor. *Microbiology of fermented foods*. Vol 1. London: Blackie Academic & Professional; 1998. p. 1-44.
21. Gullo M, Caggia C, De Vero L, Giudici P: Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;106:209-12.
22. Kondo T, Kondo M. Efficient production of acetic acid from glucose in a mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Acetobacter* sp. *J Ferm Bioeng*. 1996;81:42-6.
23. Wang Z, Yan M, Chen X, Li D, Qin L, Li Z, Yao J, Liang X. Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production. *Biochemical Engineering Journal*. 2013;79:41-5.
24. Ito T, Sota H, Honda H, Shimizu K, Kobayashi T. Efficient Acetic Acid Production by repeated fed-batch fermentation using two fermentors. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1991;36:295-9.
25. Gao C, Ma C, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*. 2011;29:930-9.
26. Datta R, Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. *J Chem Technol Biotechnol*. 2006;81:1119-29.
27. Abdel-Rahmana MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*. 2011;156:286-301.
28. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013;31(6):877-902.
29. Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004;7(2):167-79.
30. Moon SK, Wee YJ, Choi GW. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *J Biosci Bioeng*. 2012;114:155-9.
31. Karp SG, Igashiyama AH, Siqueira PF, Carvalho JC, Vandenberghe LPS, Thomaz-Soccol V, Coral J, Tholozan J-L, Pandey A, Soccol CR. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soy bean vinnasse at laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*. 2011;102:1765-72.
32. Wang L, Zhao B, Liu B, Yang C, Yu B, Li Q, et al. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. *Bioresour Technol*. 2010;101:7895-901.

33. Budhavaram NK, Fan Z. Production of lactic acid from paper sludge using acid-tolerant, thermophilic *Bacillus coagulan* strains. *Bioresour Technol.* 2009;100:5966-72.
34. Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:333-5.
35. Li A, Punt P. Industrial production of organic acids by fungi. In: Gupta VK, Schmoll M, Maki M, Tuohy M, Mazutti MA. *Applications of Microbial Engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2013. 504 p.
36. Engel CA, Straathof AJJ, Zijlmans TW, Van Gulik WM, Van der Wielen LAM. Fumaric acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;78:379-89.
37. Gu C, Zhou Y, Liu L, Tan T, Deng L. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net. *Bioresource Technology.* 2013;131:303-7.
38. Wang G, Huang D, Qi H, Wen J, Jia X, Chen Y. Rational medium optimization based on comparative metabolic profiling analysis to improve fumaric acid production. *Bioresource Technology.* 2013;137:1-8.
39. Yu S, Huang D, Wen J, Li S, Chen Y, Jia X. Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by fem to second laser irradiation. *Bioresource Technology.* 2012;114:610-5.
40. Zhou Z, Du G, Hua Z, Zhou J, Chen J. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. *Bioresource Technology.* 2011;102(20):9345-9.
41. Fu Y, Xu Q, Li S, Huang H, Chen Y. A novel multi-stage preculture strategy of *Rhizopus oryzae* ME-F12 for fumaric acid production in a stirred-tank reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology. Short Communication.* 2009.
42. Samaranayaka AGP, Li-chan ECY. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods.* 2011;3(4):229-54.
43. DeMan JM. *Principles of Food Chemistry*. 3 ed. Nova York: Springer; 1999.
44. Bremus C, Herrmann U, Bringer-Meyer S, Sahm H. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *Journal of Biotechnology.* 2006;124(1):196-205.
45. Sauer M, Branduardi P, Valloi M, Porro D. Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Applied Environmental Microbiology.* 2004;70(10):6086-91.
46. Belitz H-D, Grosch W, Schierbele P. *Food Chemistry*. 3 ed. New York: Springer; 2004.
47. Branen AL, Davidson PM, Salminen S, Thorngate III JH. *Food Additives*. 2 ed. New York: Marcel Dekker; 2002.
48. Institute of Medicine. *Dietary Reference Indicators for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Washington: NAP; 2000. Chapter 6.

49. Ogbonna JC, Tomiyama S, Tanaka H. Production of α -tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic *Euglena gracilis*. *Journal of Biotechnology*. 1999;6(1-3):213-21.
50. Durmaz Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture*. 2007; 272(1-4):717-22.
51. Campanella L, Pacifici F, Sammartino MP, Tomassetti M. A new organic phase bioenzymatic electrode for lecithin analysis in food products. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1998;47(1):25-38.
52. Penci MC, Constenla DT, Carelli AA. Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. *Food Chemistry*. 2010;120(1):332-8.
53. Yamazaki K, Imai M, Suzuki I. Soybean lecithin hydrolysis using hog pancreas phospholipase A2 influenced by the hydrophobic character of W/O microemulsion systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2004;19(2):171-9.
54. King EJ. The enzymatic hydrolysis of lecithin. *Biochemistry Journal*. 1931;25(3):799-811.
55. Lin Y, Yan T. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microbial Cell Factories*. 2012;11(42):1-9.
56. Lokeswari N, Reddy SR. Microbiological Production of Gallic Acid By a Mutant Strain of *Aspergillus Oryzae* Using Cashew Husk. *Pharmacophore*. 2010;1(2):112-22.
57. Vatter DA, Shetty K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*. 2003;39:367-79.
58. Noshly [Internet]. Food additives & Ingredients Reference [Cited 2013 Nov 5]. Available from: <http://noshly.com/>.
59. Internacional Organization of Flavor Industry (IOFI) [Internet] [Cited 2013 Dec 4]. Available from: http://www.abifra.org.br/base_iofi.pdf.
60. ANVISA [Internet]. Resolução n. 104, 1999 May 14. Consulta Pública n. 55, 2005 Jul 28 [Cited 2013 Dec 4]. Available from: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B11218-1-0%5D.PDF>.
61. Edris AE, Malone CR. Formulation of banana aroma impact ester in water-based microemulsion nano-delivery system for flavoring applications using sucrose laurate surfactant. *Procedia Food Science*. 2011;1:1821-7.
62. Kim Y, Kim YS, Yoo SH, Kim KO. Molecular structural differences between low methoxy pectins induced by pectin methyl esterase II: Effects on texture, release and perception of aroma in gels of similar modulus of elasticity. *Food Chemistry*. 2014;145: 950-5.

63. Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) [Internet]. Compêndio da Legislação de Alimentos. Revisão n. 8. 2001. Available from: <http://abia.org.br/anexos2012/livro50anosABIA.pdf>.
64. Rossi SC, Vandenberghe LPS, Pereira BMP, Gago FD, Rizzolo JA, Pandey A, Soccol CR, Medeiros ABP. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Research International*. 2009;42:484-6.
65. Mantzouridou F, Paraskevopoulou A. Volatile Bio-ester Production from Orange Pulp-Containing Medium Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Bioprocess Technology*. 2012.
66. Noguerol-Pato R, Torrado-Agrasar A, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. Influence of new generation fungicides on *Saccharomyces cerevisiae* growth, grape must fermentation and aroma biosynthesis. *Food Chemistry*. 2014;146:234-41.
67. Sieiro C, Villa TG, Silva AF, García-Fraga B, Vilanova M. Albariño wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Chemistry*. 2014;145:179-85.
68. Jelen H, Majcher M, Ginja A, Kuligowski M. Determination of compounds responsible for tempeh aroma. *Food Chemistry*. 2013;141:459-65.
69. Sampaio A, Dragone G, Vilanova M, Oliveira JM, Teixeira JA, Mussatto SI. Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground. *Food Science and Technology*. 2013;54:557-63.
70. Cvjetko M, Vorkapic-Furac J, Znidarsic-Plazl P. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. *Process Biochemistry*. 2012;47:1344-50.
71. Insumos [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. 2013. Conservação de alimentos por aditivos químicos. Available from: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/125.pdf.
72. Dishisha T, Ståhl A, Lundmark S, Hatti-Kaul R. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. *Bioresource Technology*. 2013;135:504-12.
73. Guan N, Liua L, Shin H-dong, Chen RR, Zhang J, Li J, Du G, Shi Z, Chen J. Systems-level understanding of how *Propionibacterium acidipropionici* respond to propionic acid stress at the microenvironment levels: Mechanism and application. *Journal of Biotechnology*. 2013;167:56-63.
74. Wang P, Wang Y, Liu Y, Shi H, Su Z. Novel in situ product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 by expanded bed adsorption bioreactor. *Bioresource Technology*. 2012;104:652-9.
75. U.S. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. c. 1993 [Cited 2013 Nov 1]. Food Color Facts. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/colorfac.html>.

76. ANVISA. Resolução n. 4, 1988 Sep 24 [Cited 2013 Nov 1]. Available from: www.anvisa.gov.
77. Carvalho JC, Cardoso LC, Ghiggi V, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPS, Soccol CR. Microbial Pigments. In: Brar SK, Dhillon GS, Soccol CR, editors. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. 1st ed. New York: Springer; 2014. p. 73-97.
78. Yarnell A. Bringing blue to a plate near you. Chemical and Engineering News. 2012;37:30-31.
79. Kleinegris DMM, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH. Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. Enzyme and Microbial Technology. 2011;48:253-9.
80. Yang J, Tan H, Yang R, Sun X, Zhai H, Li K. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* fermentation of cassava residues substrate. Agricultural Engineering International. 2011;13:1-6.
81. Papaioannou EH, Liakopoulou-Kyriakides M. Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. Food and Bioproducts Processing. 2010;8:305-11.
82. Varzakakou M, Roukas T, Kotzekidou P. Effect of the ratio of (+) and (-) mating type of *Blakeslea trispora* on carotene production from cheese whey in submerged fermentation. World J Microbiology Biotechnology. 2010;26:2151-6.
83. Domínguez-Espinosa RM, Webb C. Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2003;19(3):329-36.
84. Carvalho JC, Oishi BO, Woiciechowski AL, Pandey A, Soccol CR. Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-substrate fermentation and pigment extraction using different solvents. Indian J of Biotechnology. 2007;6:194-9.
85. Rangel-Yagui CO, Danesi EDG, Carvalho JCM, Sato S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. Bioresource Technology. 2004;92:133-41.
86. Mapari S, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorant. Current Opinion in Biotechnology. 2005;16(2):231-8.
87. Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. Tecnologia de alimentos. São Paulo: NBL Editora; 2009. 511 p.
88. Kiosseoglou A, Papalamprou E, Makri E, Doxastakis G, Kiosseoglou V. Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by *Xanthomonas Campestris* ATCC 1395 in batch culture. Food Research International. 2003;36:425-30.
89. Freitas F, Alves VD, Reis MAM. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends in Biotechnology. 2011;29(8):388-98.

90. Mabrouk MEM, ElAhwany AMD, Beliah MMB, Sabry SA. Xanthan production by a novel mutant strain of *Xanthomonas campestris*: Application of statistical design for optimization of process parameters. *Life Sci J.* 2013;10(1):1660-7.
91. Ben Salah R, Chaari K, Besbes S, Ktari N, Blecker C, Deroanne C, Attia H. Optimization of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. *Food Chemistry.* 2010;121(2):627-33.
92. Silva MF, Fornari RCG, Mazutti MA, de Oliveira D, Padilha FF, Cichoski AJ, Cansian RL, Di Luccio M, Treichel H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering.* 2009;90(1):119-23.
93. Menezes JDS, Druzian JI, Padilha FF, de Souza RR. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental.* 2012;8(8):1761-76.
94. Jin H, Lee NK, Shin MK, Kim SK, Kaplan DL, Lee JW. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace. *Biochemical Engineering Journal.* 2003;16:357-60.
95. Bajaj IB, Saudagar PS, Singhal RS, Pandey A. Statistical Approach to Optimization of Fermentative Production of Gellan Gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2006;102(3):150-6.
96. Nampoothiri KM, Singhania RR, Sabarinath C, Pandey A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry.* 2003;38:1513-9.
97. Salah RB, Jaouadi B, Bouaziz A, Chaari K, Blecker C, Derrouane C, Attia H, Besbes S. Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466: Purification, rheological and physico-chemical characterization. *LWT – Food Science and Technology.* 2011;44:1026-34.
98. Jiang L. Effect of nitrogen source on curdlan production by *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013;52:218-20.
99. Chèze-Lange H, et al. Production of microbial alginate in a membrane bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology.* 2002;30:656-61.
100. Moresi M, Bruno M, Parente E. Viscoelastic properties of microbial alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Food Engineering.* 2004;64:179-86.
101. Saude N, et al. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor. *Process Biochemistry.* 2002;38:273-8.
102. Müller JM, dos Santos RL, Brígido RV. Produção de alginato por micro-organismos. *Polímeros.* 2011;21(4):305-10.
103. Belitz H-D, Grosch W, Schierbele P. *Food Chemistry.* 3 ed. New York: Springer; 2004.
104. Goldberg I, Williams R. *Biotechnology and food ingredients.* New York: Springer; 1991.

105. Sano C. History of glutamate production. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;90(3):728-32.
106. Ledesma-Amaro R, Jiménez A, Santos M, Revuelta JL. Biotechnological production of feed nucleotides by microbial strain improvement. *Process Biochemistry*. 2013;48(9):1263-70.
107. ANVISA. Regulamento técnico sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as boas práticas de fabricação (BPF). Resolução RDC n. 45, 3 nov. 2010.
108. Oliveira LG, Mantovani SM. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Química Nova*. 2009;32(3):742-56.
109. Barros FFC, Quadros CP, Pastore GM. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008;28(4):979-85.
110. Nitschke M, Pastore GM. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*. 2002;25(5):772-6.
111. Dwyer MD, Brech M, Yu L, Middelberg APJ. Intensified expression and purification of a recombinant biosurfactant protein. *Chemical Engineering Science*. 2014;105:12-21.
112. Jadhav VV, Yadav A, Shouche YS, Aphale S, Moghe A, Pillai S, Arora A, Bhadekar RK. Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water. *Desalination*. 2013;318:64-71.
113. Oliveira DWF, França IWL, Félix AKN, Martins JJL, Giro MEA, Melo VMM, LRB Gonçalves. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;101:34-43.
114. Slivinski CT, Mallmann E, Araújo JM, Mitchell DA, Krieger N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*. 2012;47:1848-55.

MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A OBTENÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DE VALOR COMERCIAL

Cristine Rodrigues
Adenise Lorenci Woiciechowski
Luiz Alberto Junior Letti
Susan Grace Karp
Francieli Danubia Goelzer
Keli Cristina Alvim Sobral
Jesus Davi Coral
Tania Sila Campioni
Marcelo Adriano Corrêa Maceno
Carlos Ricardo Soccol

8.1 INTRODUÇÃO

O elevado consumo de combustíveis fósseis, especialmente dos produtos derivados do petróleo, tem gerado graves problemas ambientais. Alguns dos principais fatores das mudanças climáticas são causados pelas emissões de gases do efeito estufa (*green house gases* – GHG), tais como gás carbônico

(CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O), produzidos na combustão de combustíveis fósseis e pelo uso inadequado da terra por atividades humanas¹. Os problemas ocasionados pelo uso de combustíveis fósseis podem ser reduzidos pela substituição total ou parcial por biocombustíveis, menos poluentes, obtidos de fontes renováveis. A produção e a comercialização de biocombustíveis vêm sendo incrementadas nos últimos anos².

O etanol está presente na matriz energética de muitos países como um dos biocombustíveis mais promissores como forma de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis, especialmente no transporte rodoviário. Pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, tais como: cana-de-açúcar, milho, arroz, batata, entre outras fontes de produtos de alimentos. Isso gera uma competição entre a produção de alimentos e a produção de combustíveis.

No sentido de evitar esse problema, uma fonte importante e promissora para a produção de etanol é o material lignocelulósico, principalmente os resíduos agroindustriais, tais como resíduos do processamento da palma (dendê), bagaço de cana, resíduos municipais, palha de milho, trigo, arroz, pele de mandarina, limão, laranja, entre outros, sendo essas as fontes mais usadas e pesquisadas na atualidade^{2,3}.

O material lignocelulósico é composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, numa estrutura cristalina vegetal altamente estável que deve ser rompida mediante pré-tratamentos para disponibilizar a fração sacarídica (celulose e hemicelulose) na forma de açúcares fermentescíveis^{2,4}.

Antes de qualquer tratamento termoquímico, a secagem é uma das primeiras etapas do processamento dos resíduos lignocelulósicos, principalmente para aqueles que necessitam ser transportados ou estocados. Essa etapa é necessária para reduzir a atividade de água, com consequente diminuição da velocidade de reações de deterioração do material, do crescimento microbiano, de processos químicos de escurecimento por oxidação e atividade enzimática⁵.

Na sequência, etapas de moagem são necessárias para aumentar a área superficial, através da redução dos tamanhos de partícula, além de diminuir o grau de polimerização do resíduo⁶ e uniformizar o tamanho das partículas para melhorar a eficiência dos tratamentos subsequentes. O tamanho das partículas de uma amostra é um dos principais fatores quando se estuda o pré-tratamento de resíduos, pois tem influência na área de contato e difusão dos reagentes químicos na estrutura lignocelulósica, que são fenômenos de superfície^{7,8}.

Novos processos, como a extrusão, congelamento e o uso de irradiação por micro-ondas, têm sido utilizados para preparar o resíduo lignocelulósico para as etapas posteriores de pré-tratamentos químicos e enzimáticos^{9,10}. Entretanto, esses processos de pré-tratamentos físicos demandam grande quantidade de energia, aumentando o custo do processo, sem remoção da lignina¹¹.

No sentido de contribuir para os estudos no aproveitamento desses materiais, neste capítulo serão descritos os principais processos de pré-tratamentos utilizados para a obtenção de diferentes biomoléculas a partir de materiais lignocelulósicos.

8.2 HISTÓRICO

Os materiais lignocelulósicos têm sido utilizados pelo homem desde a Antiguidade para a obtenção de energia. A queima da madeira na forma de galhos e folhas foi a principal fonte de energia térmica e luminosa usada por milênios, auxiliando no preparo de alimentos, na defesa do homem contra predadores e no aquecimento durante os períodos de frio intenso.

Durante a Revolução Industrial, nos século XVIII, a principal fonte de energia passou a ser o carvão de origem mineral, que desempenhou papel fundamental para o estabelecimento e consolidação das primeiras matrizes industriais na Inglaterra e, em um segundo momento, na Europa, nas Américas e ao redor de todo o mundo. A partir do século XX, com os automóveis, o petróleo assumiu o papel central como matéria-prima para obtenção de combustíveis e energia. No entanto, problemas ambientais (e também econômicos e políticos) decorrentes do uso do carvão mineral e do petróleo chamam novamente a atenção do mundo para o uso de matérias-primas celulósicas, as biomassas, como provedoras de energia e de outras biomoléculas de valor econômico. As fontes de energia classificadas como renováveis, limpas e verdes, como as biomassas, tendem a assumir papel central na economia e política em quase todos os países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Notadamente o etanol obtido a partir de açúcares diretamente fermentescíveis e mais recentemente a partir de materiais lignocelulósicos sacarificados (etanol de segunda geração) tem um papel importante nesse histórico.

As primeiras notas sobre uso de material lignocelulósico para obtenção de etanol datam de 1819, por Braconnet. Em 1894, Simonsen tratou serragem com ácidos diluídos e altas pressões, processo que gerou etanol a taxas de 7 L a 9 L para cada 100 kg de material seco. A partir do final do século

XIX o ácido sulfúrico passou a ser empregado nas hidrólises. Estados Unidos (resíduos de pinus) e França (serragem) se destacavam na produção de etanol celulósico em escala industrial, mas ainda com rendimentos bastante modestos. Durante a Primeira Guerra Mundial o interesse pela produção de etanol a partir de madeira se intensificou, notadamente pela Alemanha, pela necessidade de suplementar o abastecimento energético¹².

As primeiras tentativas de se utilizar enzimas para hidrólise de materiais lignocelulósicos se deram no início da década de 1970, no Japão. Em decorrência dessa tecnologia, logo surgiram processos de sacarificação e fermentação simultânea. O Brasil, no final da década de 1970 (com o projeto COALBRA) tentou implantar uma usina experimental para produção de etanol celulósico, em Uberlândia, Minas Gerais. A unidade teria capacidade de produção diária de 30.000 L de etanol e utilizaria o eucalipto da região como matéria-prima. O projeto não obteve êxito devido a uma série de questões técnicas, como, por exemplo, a dificuldade de se trabalhar com o tipo de madeira disponível e problemas com o processo fermentativo. Na mesma década, outra tentativa (também sem êxito) se deu na cidade de Lorena, no estado de São Paulo, com uma unidade piloto de hidrólise ácida (processo Madison), que faz a hidrólise contínua da madeira em um sistema de percolação de ácido sulfúrico diluído. Na década de 1980 a empresa Dedine (São Paulo) estabeleceu um processo de hidrólise do bagaço de cana (com ácidos concentrados) seguido por fermentação para obtenção de etanol. No entanto, as pentoses geradas durante a hidrólise eram subaproveitadas. Atualmente diversas empresas (principalmente norte-americanas) investem em produção de etanol de segunda geração. No Brasil, destaca-se uma unidade piloto na cidade de Piracicaba, São Paulo, em funcionamento, com capacidade diária de produção de 1.000 L de etanol. Tal unidade é fruto de uma parceria entre a Novozymes (multinacional dinamarquesa) e o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC)¹³.

Além do etanol de segunda geração obtido a partir de celulose e/ou hemicelulose, o potencial dos materiais lignocelulósicos como fonte de outras biomoléculas tem sido explorado recentemente. Muitas pesquisas têm sido feitas, e novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas com esse propósito (e também para aumentar os rendimentos de produção de etanol de segunda geração). Por isso, atualmente são valorizados pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos que preservem seus polissacarídeos e açúcares totais¹⁴, bem como a lignina.

Tem-se evidenciado, por exemplo, o potencial uso de componentes hemicelulósicos como biopolímeros¹⁵ em indústrias de alimentos, biomédicas e

de cosméticos¹⁶; como polímeros iônicos, hidrogéis para liberação gradativa de drogas¹⁷ e uma infinidade de possibilidades de usos para frações específicas, por exemplo, glucomanas e arabinogalactanas como ingredientes de alimentos, bebidas e na medicina¹⁸.

Recentemente, muita atenção tem se voltado também à lignina. Em geral ela é queimada para a produção direta de energia térmica, mas esse processo é pouco vantajoso por exigir uma etapa prévia de concentração para diminuir a quantidade de água. Alternativas mais interessantes do ponto de vista econômico e ambiental são, dentre outras, a própria produção de biocombustíveis e geração de biomoléculas como aldeídos aromáticos e produtos fenólicos. Conversão hidrotérmica, pirólise, degradação enzimática, degradação fotocatalizada e oxidação por irradiação de micro-ondas e bio-transformação são algumas das técnicas atualmente estudadas para agregar valor às ligninas¹⁹.

8.3 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são os materiais orgânicos mais abundantes da biosfera, representando aproximadamente 60% da biomassa vegetal. Podem ser divididos em seis grupos principais: resíduos de colheitas (bagaço de cana, palha de milho etc.), madeira de lei (álamo alpino e álamo), madeira de conífera (pinheiro e abeto), resíduos celulósicos (lodo de papel e papel reciclado, jornais etc.), biomassas herbáceas (feno de alfafa, caníço-malhado etc.) e resíduos sólidos municipais²⁰.

Esses materiais apresentam uma rede complexa e resistente composta principalmente por lignina (10% a 30%), hemicelulose (15% a 35%) e celulose (30% a 50%), sendo a concentração de cada um desses elementos variável de acordo com o tipo de matéria-prima em questão, idade e estágio vegetativo^{21,22}.

O principal componente dos materiais lignocelulósicos é a celulose, polissacarídeo formado por moléculas de glicose unidas através de ligações β -1,4-glicosídicas. Cadeias de celulose são estabilizadas e ligadas entre si por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, formando as fibrilas elementares, que contêm cerca de 36 cadeias justapostas e apresentam 3 nm a 4 nm de largura. Essas fibrilas são unidas umas às outras através da hemicelulose, o segundo mais abundante componente da lignocelulose, que é um polisacarídeo amorfo, composto por vários açúcares de cinco e seis carbonos, como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose, além de desoxiaçúcares

e ácidos urônicos. Essas estruturas são cobertas pela lignina, um polímero aromático formado por três estruturas básicas fenólicas, o álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico e seus derivados²².

Cada uma das porções dos materiais lignocelulósicos pode ser utilizada com uma finalidade, por exemplo, as porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa podem ser hidrolisadas a vários açúcares e então fermentadas. As ligninas, por sua vez, podem ser degradadas a frações de massas molares menores, sendo utilizadas em vários processos químicos, como na fabricação de espumas de poliuretanos, resinas fenólicas e epóxi, na produção de fenol e etileno, e podem ser convertidas em fibras de carbono^{23,24}.

Os resíduos e materiais lignocelulósicos podem ser usados como matéria-prima para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos²⁵. Propriedades como o teor de lignina, acessibilidade da celulose a enzimas e micro-organismos e o grau de cristalinidade da celulose determinam a digestibilidade total da biomassa e sua futura aplicabilidade.

Alguns dos subprodutos da agropecuária, como bagaço de cana, palha de cana, arroz e trigo estão sendo utilizados biotecnologicamente na produção de produtos como acetato de celulose, blendas e compósitos, etanol de segunda geração, hidroximetilfurfural, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, alcaloides, enzimas, xilitol, polpa celulósica, celulose bacteriana, e também na produção de energia²⁶⁻⁴⁷.

Embora os resíduos lignocelulósicos agroindustriais necessitem, na sua maioria, de um tratamento prévio por meio de hidrólise ácida ou enzimática para disponibilizar os açúcares fermentescíveis, é importante destacar a importância dessas matérias-primas, uma vez que apresentam baixo custo e alta disponibilidade.

A oferta de resíduos lignocelulósicos em todo o mundo corresponde a aproximadamente $2,9 \times 10^3$ milhões de toneladas produzidas de culturas de cereais, 3×10^3 da produção de sementes e $5,4 \times 10^2$ de outros tipos de cultura⁴⁸, além de 40 milhões de toneladas de materiais vegetais não comestíveis, incluindo os caules de trigo, palha de milho (os talos e folhas) e aparas de madeira da exploração madeireira, que são, em sua maioria, descartados como resíduo⁴⁹.

O Brasil destaca-se mundialmente pela agricultura e pelo agronegócio, com uma grande área cultivável de grãos, cereais, frutas e principalmente com a cultura da cana-de-açúcar. O último levantamento da safra 2012/2013 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) mostrou que foram produzidas no Brasil 893,5 mil toneladas de algodão-carço;

96,6 mil toneladas de amendoim; 2,39 milhões de toneladas de arroz, 168,7 mil toneladas de aveia; 43,8 mil toneladas de canola; 2,3 mil toneladas de centeio; 102,8 mil toneladas de cevada; 3,11 milhões de toneladas de feijão; 68,7 mil toneladas de girassol; 15,82 milhões de toneladas de milho; 27,73 milhões de toneladas de soja; 1,89 milhões de toneladas de trigo; e 652,02 milhões de toneladas de cana-de-açúcar^{50,51}, gerando, portanto, uma grande quantidade de subprodutos como os resíduos lignocelulósicos.

8.4 TRATAMENTOS QUÍMICOS

8.4.1 Pré-tratamento com ácidos

A hidrólise ácida é um dos pré-tratamentos mais promissores e extensivamente estudados e empregados. A eficiência da obtenção de xilose a partir da hidrólise da hemicelulose pode oscilar entre 75% a 90%, sendo este o principal monossacarídeo obtido; outros açúcares, como glicose e arabinose, são obtidos em menores quantidades⁵².

Apesar da elevada eficiência na recuperação de açúcares, a formação de subprodutos como ácido acético e furfural podem gerar problemas no processo por serem agentes inibitórios dos processos fermentativos^{53,54}. Industrialmente se utiliza ácido diluído e condições brandas de temperatura, até 120 °C, pois nessas condições é produzida menor quantidade destes inibidores da fermentação. São utilizados ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3), ácido fosfórico (H_3PO_4), sendo o H_2SO_4 o principal⁵⁵⁻⁵⁸.

No processo com ácido diluído, a produção de xilose a partir da hemicelulose é mais adequada em condições brandas de tratamento. Isto se dá pelo fato de a estrutura cristalina da celulose só ser afetada significativamente em condições mais severas. O pré-tratamento térmico pode ser realizado tanto por tempo baixo (cinco minutos) e temperatura elevada (180 °C) ou durante um tempo de tratamento maior (30 a 90 minutos) e temperaturas mais baixas (120 °C). Com temperaturas médias (140 °C a 170 °C) e baixas concentrações de ácido (0,1% a 1%), pode-se alcançar taxas significativas na hidrólise da celulose, sendo que quase 100% da hemicelulose é hidrolisada⁵⁹.

Estudos feitos com bagaço de palma, mediante uma hidrólise ácida, seguida de uma lavagem alcalina, mostraram que na primeira etapa houve uma remoção de 90% da hemicelulose e 32% da lignina, e após o processo

alcalino observou-se uma deslignificação de 70%, gerando uma biomassa com 82% de celulose, aumentando dessa forma a digestibilidade enzimática⁵⁴.

8.4.2 Pré-tratamento alcalino

O principal efeito do pré-tratamento alcalino sobre a biomassa é a deslignificação (amolecimento e solubilização da lignina), tornando a hemicelulose e a celulose mais acessíveis a processos de hidrólise posteriores. O uso de agentes alcalinos promove um inchaço nas fibras, repercutindo nas ligações da hemicelulose e celulose, aumentando assim a porosidade da biomassa^{60,61}.

Os agentes alcalinos mais utilizados são: hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e amônia. Destes, o mais estudado é o NaOH⁶²⁻⁶⁵; entretanto, o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tem se mostrado efetivo como agente de pré-tratamento e é mais barato que o NaOH⁶⁶. A amônia também tem sido testada para vários resíduos, sendo altamente seletiva na remoção da lignina e abertura do resíduo lignocelulósico, com a vantagem de ser facilmente recuperada devido à sua alta volatilidade⁶⁷.

Nos estudos de pré-tratamento para palha de milho, Li e Kim⁶⁸ obtiveram 55% de deslignificação do resíduo quando tratado com amônia aquosa a 50% (m/m) por quatro semanas a 30 °C, na proporção 1:5 (massa de resíduo/volume do álcali). O pré-tratamento também se mostrou eficiente para a acessibilidade da celulose, apresentando 86,5% de conversão em glicose. Jung et al.⁶⁹ obtiveram resultados semelhantes, 43,6% de deslignificação após o tratamento de cachos vazios de palma com amônia aquosa 14% (m/m) por 12 horas a 80 °C, na proporção de 1:12 (m/v), com uma conversão de 89,6% de celulose em glicose.

A principal desvantagem de se utilizar pré-tratamento alcalino está na desacetilação da hemicelulose, gerando ácido acético em solução. Entretanto, dependendo das condições de tratamento (tempo, concentração, temperatura) e do álcali utilizado, obtêm-se bons rendimentos. Geralmente, NaOH e KOH são preferidos⁷⁰. Outras desvantagens estão nos tempos de tratamento, que podem variar de horas até dias, e na necessidade de neutralização do hidrolisado^{6,9}.

Brienzo, Siqueira e Milagres⁷¹ elaboraram um processo para deslignificação do bagaço de cana, maximizando a extração de hemicelulose com solução alcalina de NaOH, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e sulfato de magnésio (MgSO_4). Inicialmente, as amostras foram lavadas com solução de

EDTA 0,2% (m/v), para remover traços de metais como ferro e magnésio, que interferem na oxidação pelo H_2O_2 . Nas condições utilizadas (6% de H_2O_2 , pH 11,6, 4 horas e 20 °C), obteve-se 86% de conversão de hemicelulose e máxima deslignificação (94,1%). Melhor resultado, 94,5% de conversão de hemicelulose, foi obtido nas condições de 4% de H_2O_2 , 0,25% de MgSO_4 , pH 11,6; 10 horas e 40 °C, mas houve uma redução na deslignificação (91%). Esse estudo indica que o processo alcalino é eficiente tanto na deslignificação como na conversão de hemicelulose, dependendo das condições utilizadas.

8.4.3 Pré-tratamentos físico-químicos

Nos pré-tratamentos físico-químicos são utilizados agentes químicos ácidos, alcalinos ou água, conjuntamente com processos físicos tais como: incremento de temperatura ou pressão, processos de descompressão rápida, uso de ultrassom, entre outros, para atingir dois propósitos: aumentar a área superficial do material sólido e hidrolisar parcial ou totalmente a biomassa. Os principais processos são descritos a seguir.

8.4.3.1 Explosão a vapor (SE)

A explosão a vapor (do inglês *steam explosion* – SE) é uma técnica de pré-tratamento que envolve o tratamento da biomassa com vapor a elevadas temperaturas (190 °C a 240 °C) e pressões (20 bar a 50 bar) com tempos de residência de 3 a 20 minutos, seguido por descompressão rápida, que rompe a estrutura do material fibroso que é recolhido em um ciclone em porções sólidas e um resíduo líquido⁷²⁻⁷⁴.

O sólido tem a estrutura química modificada, apresentando uma maior área superficial. O resíduo líquido é de cor marrom escura, contendo o produto da hidrólise (despolimerização) da hemicelulose (xilose e arabinose), parte da celulose hidrolisada a glicose, e parte da lignina solúvel em meio ácido. Devido a elevadas temperaturas de tratamento térmico, produzem-se compostos inibitórios para os processos fermentativos: ácido acético, furfural e hidroximetil furfural (HMF). Tais compostos têm sido reportados por diversos autores como os principais subprodutos formados pela SE e presentes no licor gerado^{58,75-79}.

O processo de SE pode ter caráter autocatalítico, isto é: o processo gera hidrólise parcial da biomassa sem presença de catalisador algum. No entanto, a biomassa pode ser impregnada com agentes ácidos para melhorar o pré-tratamento. São ácidos minerais como os ácidos sulfúrico, fosfórico e sulfuroso e agentes alcalinos como amônia e hidróxido de sódio^{80,81}.

Na Tabela 8.1 são apresentados alguns dados sobre SE para diferentes tipos de biomassa.

Tabela 8.1 Tipos de biomassa e condições de operação da SE

| BIOMASSA | TEMPERATURA (°C) | PRESSÃO (MPa) | TEMPO (MIN.) | CATALISADOR | AÇÚCARES RECUPERADOS | REFERÊNCIA |
|------------------------|------------------|---------------|--------------|-------------------------------------|---|------------|
| Bagaço de cana | 200 | n. r. | 5 | SO ₂ 2% | Glicose: 2,6 ^a Xilose: 10,9 ^a Arabinose: 1,5 ^a | 82 |
| Palha de trigo | 190 | n. r. | 10 | H ₂ SO ₄ 0,2% | Glicose: 2,3 ^a Xilose: 21,8 ^a Arabinose: 3,3 ^a | 82 |
| Palha de milho | 200 | 1,6 | 5 | sem | Glicose: 2,9 ^b Xilose: 5,1 ^b Arabinose: 1,37 ^b | 83 |
| Cachos vazios de palma | 140 | 0,28 | 15 a 60 | sem | Celulose: 304 ^c Hemicelulose: 299 ^c | 84 |

Legenda: n. r., não reportado; ^a g L⁻¹; ^b g/100 g de biomassa; ^c g.Kg⁻¹ de biomassa.

8.4.3.2 Água quente (LHW)

O pré-tratamento de material lignocelulósico com água quente (do inglês *hot liquid water* – LHW) é uma técnica similar à explosão a vapor, usando água quente ou vapor saturado para hidrolisar a hemicelulose. Devido ao uso de temperaturas mais baixas que a SE, a celulose permanece mais ligada à estrutura da biomassa e a formação de inibidores é menor⁸⁵⁻⁸⁷.

A seleção dos valores das variáveis do processo como temperatura, tempo de residência, quantidade de catalisador e tipo de catalisador dependem do tipo de biomassa. A temperatura típica oscila entre 170 °C e 230 °C, as pressões ficam acima dos 5 MPa e o tempo de residência é de cerca de cinco minutos⁶. O uso de temperaturas elevadas (acima de 130 °C) dá um caráter

de autocatálise ao processo de LHW, visto que o uso de catalisadores ácidos ou alcalinos não é necessário⁸⁸.

A técnica de LHW é muito usada na indústria do papel, bem como a técnica de SE. Portanto, para se avaliar o efeito de variáveis como temperatura, tempo de residência e concentração de ácido, as mesmas correlações que são usadas em explosão a vapor são válidas para o processo de LHW⁸⁹.

Na Tabela 8.2 são apresentados alguns dados reportados na literatura do uso do LHW como técnica de pré-tratamento para alguns tipos de biomassa.

Tabela 8.2 Tipos de biomassa e condições do processo de LHW sem adição de catalisadores

| BIOMASSA | TEMPERATURA (°C) | PRESSÃO (MPa) | TEMPO (MIN.) | AÇÚCARES RECUPERADOS | REFERÊNCIA |
|---------------------------------|------------------|---------------|--------------|---|------------|
| Bagaço de cana | 160 a 180 | n. r. | 20 a 40 | Galactose: 0,24 ^a Xilose: 6,87 ^a Arabinose: 0,52 ^a | 90 |
| Palha de trigo | 170 a 220 | n. r. | 0 a 40 | Celulose: 2,3 ^b Hemicelulose: 38,5 ^b | 91 |
| Eucalipto (<i>E. grandis</i>) | 180 a 200 | n. r. | 10 a 6 | Glucan: 41,9 ^c Xylan: 1,1 ^c | 92 |

Legenda: n. r., não reportado; ^a g L⁻¹; ^b percentagem de rendimento com respeito à massa inicial da biomassa; ^c composição do sólido pré-tratado.

8.4.4 Outros pré-tratamentos

Diversos outros processos de pré-tratamento têm surgido, entre os quais se destacam o processo de explosão de fibra com amônio, (do inglês *ammonia fiber expansion* – AFEX), os processos de ultrassom, os líquidos iônicos, a ozonólise, dentre outros.

8.4.4.1 Processo AFEX

Neste processo, amônio líquido é adicionado ao material lignocelulósico, que é, então, tratado como na SE, isto é, a temperaturas e pressões elevadas seguidas de uma rápida descompressão^{93,94}.

As condições de operação de temperatura e tempo de tratamento utilizadas são menores quando comparadas ao processo SE. Geralmente as temperaturas estão dentro da faixa de 60 °C a 100 °C e os tempos de residência são de cinco a dez minutos.

A quantidade de amônio é de aproximadamente 1 kg por quilo de biomassa seca, sendo esta uma das principais desvantagens do processo, já que é necessário um sistema de recuperação eficiente do amônio, devido a fatores ambientais e econômicos⁹⁵.

O processo AFEX não hidrolisa a biomassa propriamente dita, mas sim modifica a estrutura, permitindo maior área superficial para os processos posteriores de hidrólises ácida e enzimática. Essa característica se traduz em baixos rendimentos nas etapas de processamento posteriores ao AFEX, com materiais lignocelulósicos com elevados teores de lignina^{93,96}.

8.4.4.2 Ultrassom

A técnica está pautada na formação de bolhas de cavitação dentro do meio líquido pelas ondas de ultrassom. As bolhas geradas podem implodir gerando condições extremas de temperatura e pressão (500 K e 50 MPa) e cavitação, o que ocasiona uma degradação da estrutura do material lignocelulósico e produção de radicais livres⁹⁷. Tem sido reportado que ultrassom com frequências de 23 kHz a 45 kHz incrementa a porosidade das fibras da celulose, rompe ligações α -O-4 ou β -O-4 da lignina e diminui a cristalinidade do material lignocelulósico^{98,99}.

A técnica de ultrassom como pré-tratamento da biomassa para produção de etanol ainda não é amplamente usada. Na Tabela 8.3 estão apresentados alguns dados e referências do uso desta técnica.

Tabela 8.3 Biomassa pré-tratada com ultrassom

| BIOMASSA | MEIO | TEMPERATURA (°C) | TEMPO (MIN.) | AÇÚCARES RECUPERADOS | REFERÊNCIA |
|----------------|---------------------|------------------|--------------|--|------------|
| Bagaço de cana | NaOH (0,25 – 3,35%) | 120 | 60 | Glucose: 0,71 ^a Xilose 9,0 ^a Arabinose 1,42 ^a | 100 |
| Kenaf | Água | 30 | 0 a 120 | Cellulose: 38 ^b Hemicellulose: 58 ^b | 98 |

| BIOMASSA | MEIO | TEMPERATURA (°C) | TEMPO (MIN.) | AÇÚCARES RECUPERADOS | REFERÊNCIA |
|---------------------------|--|---------------------|-----------------|-------------------------|------------|
| Cachos vazios de palma | H ₂ SO ₄ (2%v/v) | 25 | 15 a 45 | Xylose 60 ^c | 99 |

Legenda: ^a g L⁻¹; ^b percentagem de recuperação; ^c rendimento de xilose depois do pré-tratamento.

8.4.5 Pré-tratamento biológico – Biopolpação

A biopolpação é um método empregado para a obtenção da polpa de celulose a partir de material lignocelulósico por meio da utilização de micro-organismos que degradam seletivamente a lignina e a hemicelulose e preferencialmente mantêm intacta a celulose.

Durante o processo de biopolpação o grau de polimerização da celulose pode ser reduzida aumentando a proporção de regiões terminais, que é mais suscetível à hidrólise. Grande quantidade de hemicelulose é hidrolisada, enquanto a lignina também é em grande parte retirada ou degradada¹⁰¹.

A biopolpação é um processo complexo que envolve várias enzimas mediadas por uma série de pequenas moléculas que trabalham sinergicamente. Micro-organismos (fungos e bactérias), ou somente enzimas produzidas por eles, são utilizadas no tratamento biológico. No mercado podem ser encontradas essas preparações enzimáticas, contendo enzimas hidrolíticas e oxidativas, que são amplamente usadas no lugar dos micro-organismos¹⁰².

Em geral, a tecnologia de bioprocessamento da matéria-prima lignocelulósica e/ou dos seus constituintes para bioprodutos é composta por três etapas: projeto inicial do processo, otimização do sistema e desenvolvimento do modelo. O processamento envolve o uso de biocatalisadores, micro-organismos ou as suas próprias enzimas ou enzimas de outros organismos para promover a bioconversão de matérias-primas em novos produtos, a recuperação e purificação de tais bioprodutos e, posteriormente, ajustes do *downstream*¹⁰³.

Normalmente o bioprocesso é realizado por fungos basidiomicetos de degradação da madeira, e após a degradação fúngica o resultado são carboidratos facilmente metabolizáveis¹⁰⁴. Fungos de degradação “branca”, os principais basidiomicetos utilizados no tratamento biológico de resíduos agroindustriais, são seletivos para a quebra da lignina e da hemicelulose¹⁰⁵. A degradação fúngica da biomassa lignocelulósica é amplamente utilizada

e ocorre no meio extracelular, pela ação de enzimas secretadas no meio pelos micro-organismos. Os fungos possuem um sistema enzimático extracelular de alta eficiência responsável pela degradação, dentre eles o sistema de hidrólise, que produz hidrolases responsáveis pela degradação dos polisacarídeos, além de um sistema ligninolítico oxidativo que degrada a lignina e abre os anéis fenólicos¹⁰⁶.

Pleurotus sajor-caju, *P. pulmonarius* e *Lentinus edodes* foram utilizados para o tratamento biológico de grãos de cevada, e conseguiram remover a lignina e a hemicelulose, deixando a celulose relativamente intacta para servir de alimento para ruminantes. Concluiu-se, ainda, que a fermentação no estado sólido com esses fungos superiores leva algum tempo para acontecer, e que as enzimas lignocelulolíticas são produzidas durante o metabolismo secundário na fase estacionária, quando ocorre a quebra da lignina. Durante a fase de crescimento, hemicelulose e outros compostos hidrossolúveis são preferencialmente utilizados¹⁰⁷.

No Japão, o pré-tratamento biológico da palha de arroz com fungos da degradação branca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pleurotus ostreatus*), em regime de fermentação no estado sólido, foi usado para aumentar a suscetibilidade dos carboidratos à hidrólise enzimática. *P. ostreatus* se destacou na degradação seletiva da lignina após 60 dias de cultivo, enquanto a celulose e hemicelulose ficaram praticamente intactas. Quando o teor de lignina foi reduzido para menos de 15% (m/m), houve um incremento significativo na degradação enzimática dos carboidratos¹⁰⁸.

Dias et al.¹⁰⁹ indicam aumento considerável da acessibilidade de celulose na palha de trigo (três a quatro vezes), após pré-tratamento com basidiomicetos *Irpex lacteus* e EUC-1 em fermentação no estado sólido. Ambas as cepas revelaram baixas atividades celulolíticas e xilanolíticas, mas altas atividades ligninolíticas, especialmente da enzima manganês peroxidase (MnP). A alta atividade de MnP parece ser um pré-requisito importante para o sucesso da biopolpação fúngica, uma vez que, no caso de *I. lacteus*, a atividade de lacase não foi detectada durante todos os períodos de pré-tratamentos. A razão inicial de celulose/lignina na palha de trigo de 2,7 foi aumentada para 5,9 e 4,6 (percentagem de celulose/percentagem de lignina) após o pré-tratamento por basidiomicetos EUC-1 e *I. lacteus*, respectivamente. Portanto, essas cepas poderiam ser utilizadas para promover a bioconversão de materiais lignocelulósicos.

Segundo Arora e colaboradores¹¹⁰, o actinomiceto aeróbio *Streptomyces griseus* B1, isolado do solo, é capaz de produzir altos níveis de enzimas

hidrolíticas de lignocelulose. O micro-organismo atacou e modificou a lignina até certo ponto, transformou-a em fragmentos solúveis, mas não a utilizou como fonte de carbono.

Três bactérias produtoras de enzimas que degradam a lignina foram isoladas da palma, a saber: *Bacillus* sp., *Ochrobactrum* sp. e *Leucobacter* sp. As enzimas produzidas foram lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase em fermentação submersa. Depois as enzimas foram utilizadas na deslignificação dos cachos vazios da palma (*empty fruit bunches* – EFB)¹¹¹.

No trabalho de Bandounas e colaboradores¹¹², a mineralização e despolimerização da lignina são processos isolados e desafiam ainda mais a seleção de micro-organismos ligninolíticos produtores de enzimas ligninolíticas específicas.

O uso de fungos em projetos de degradação biológica é atraente devido ao seu baixo custo e ao seu sistema de hidrólise enzimática da lignocelulose. Como vantagens do pré-tratamento biológico podemos ressaltar: a baixa exigência de consumo de energia, pouca exigência química, condições ambientais suaves, produção de baixa quantidade de compostos inibidores da fermentação em relação a outros tipos de pré-tratamentos¹⁰¹, baixo custo e eficiente sistema de hidrólise¹⁰⁶. Entretanto, o rendimento do tratamento é muito baixo na maioria dos processos biológicos¹⁰⁵.

Devido ao baixo rendimento alguns tratamentos biológicos são realizados em conjunto com tratamentos físico-químicos. Um pré-tratamento combinado de *Populus tomentosa* utilizando fungos de degradação branca e o sistema LHW foi realizado por Wang et al. (2012). A combinação desses pré-tratamentos apresentou bom desempenho na remoção de hemicelulose e favoreceu a digestão da celulose quando comparada à utilização somente do tratamento LHW. A maior remoção de hemicelulose (92,33%) foi observada pela combinação de *Lenzites betulina* com tratamento LHW, além de proporcionar um aumento de 2,66 vezes do rendimento de recuperação de glicose¹¹³. Para melhorar os resultados já citados de Tanigushi¹⁰⁸, o autor testou os efeitos da explosão a vapor (1,5 MPa, um minuto) combinado com o tratamento de palha de arroz com *P. ostreatus* e avaliou a alteração da composição dos componentes e a suscetibilidade à hidrólise enzimática. Quando a palha de arroz foi pré-tratada com explosão a vapor antes do tratamento biológico, o tempo de tratamento necessário para a obtenção de um xarope de glicose com 33% de rendimento foi reduzido de 60 para 36 dias. A redução se dá, provavelmente, devido ao afrouxamento das interações que formam a estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulolíticos entre a lignina e os carboidratos durante o tratamento biológico¹¹⁴.

8.5 ENZIMAS QUE ATUAM NA DEGRADAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Enzimas lignocelulolíticas têm importantes aplicações em vários setores, incluindo a fabricação de produtos químicos, combustível, cerveja e vinho, alimentação animal, indústria têxtil e de lavanderia, papel e celulose e agricultura. Muitos estudos estão sendo realizados focados na redução do custo das enzimas, dentre os quais podemos destacar: *screening* de micro-organismos produtores de novas enzimas, melhoramento genético das cepas industriais existentes e engenharia enzimática, modelos de produção e operação de fatores relacionados, como escolha de substrato, condições de cultura, reciclagem de enzimas e remodelagem de processos¹⁰³.

A degradação da biomassa lignocelulósica necessita de um conjunto de enzimas que atuam sinergicamente para a hidrólise total, devido à complexidade do substrato. Três ou mais grupos diferentes de enzimas são normalmente necessários, dependendo do produto final desejado, ou o grau de hidrólise necessária. Os principais e seletivos grupos de enzimas incluem celulasas, hemicelulasas e ligninases.

Apesar de a celulose ser um homopolissacarídeo, fungos que degradam a celulose produzem enzimas que formam sistemas enzimáticos complexos. O *Trichoderma reesei*, fungo mais estudado para produção de celulasas, produz duas celobiohidrolases, cinco endoglucanases e duas α -glicosidases já caracterizadas; além dessas, três supostas endoglucanases e cinco β -glicosidases que foram identificadas com base na similaridade da sequência dos genes de enzimas conhecidas¹¹⁵.

Pelo menos três grupos de celulasas estão envolvidos no processo de hidrólise da celulose: endoglucanase (EG; endo 1,4- β -D-glucanases ou endo-1,4-glucanohidrolase; EC 3.2.1.3) ataca as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, gerando extremidades livres; exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH I e II ou ExG; 1,4- β -glucano-celobiohidrolase ou exo-1,4- β -D-glucanase; EC 3.2.1.91), que degrada a molécula por remoção das unidades de celobiose e/ou glicose das extremidades livres, e o terceiro grupo de enzimas que trabalham em conjunto e em sinergia com a CBH e EG, são β -glucosidases (BG; EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose para produzir glicose^{94,105,106,116}. As celulasas devem aderir à superfície das partículas do substrato antes da hidrólise da celulose. A estrutura 3D das partículas em combinação com sua forma e tamanho são determinantes para a suscetibilidade ou não das ligações β -glicosídicas à hidrólise enzimática¹¹⁶.

EG tem um sítio ativo em formato de fenda aberta, o que permite a sua ligação em qualquer local ao longo da cadeia de polímero de celulose, mas mostra ser mais eficaz nas regiões amorfas, enquanto o sítio catalítico de ExG está dentro de um túnel formado na estrutura da enzima^{117,118}.

Os micro-organismos mais utilizados na produção de enzimas celulo-líticas incluem: espécies de fungos *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* e *Aspergillus*; bactérias *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* e actinomicetos *Streptomyces* e *Actinomucor*, sendo que o *Trichoderma reesei* é o principal produtor inclusive industrialmente, estando presente na preparação comercial Celluclast® da Novozymes.

No caso da hemicelulose, por apresentar composição tão heterogênea (pentoses, hexoses e/ou ácidos urônicos)¹¹⁹, mais enzimas são necessárias para atuar sinergicamente na sua hidrólise total em relação às enzimas que atuam na celulose^{120,121}. A xilana é a hemicelulose mais abundante, e as enzimas xilanases são as hemicelulases mais indicadas para a hidrólise enzimática deste substrato¹⁰³.

As endoxilanases atuam nas cadeias principais da xilana, e as β -xilosidades hidrolisam os xilo-oligossacarídeos em xilose. A α -arabinofuranosidase e α -glucuronidase removem a arabinose e os substituintes do ácido 4-O-metil glicurônico, respectivamente, das cadeias de xilana. Ainda, concorrem no processo as esterases hemicelulolíticas incluindo acetil esterases que hidrolisam os substituintes de acetil nas frações da xilose, e feruloil esterases que hidrolisam a ligação éster entre os substituintes de arabinose e ácido ferúlico. Feruloil esterases ajudam na liberação da fração hemicelulósica da lignina e tornam o polissacarídeo livre, mais favorável à degradação pelas outras hemicelulases^{116,103}.

As xilanases auxiliam na catálise da hidrólise das ligações glicosídicas na cadeia da xilana, reduzindo o grau de polimerização do substrato, aumentando o brilho da polpa (facilitando, assim, a extração química da lignina da polpa celulósica na subsequente extração alcalina) e provocando a diminuição de interferentes na reação. Xilanases microbianas livres de celulase, alcalinas e termoestáveis são ideais para biopolpação e branqueamento de resíduos lignocelulósicos¹²².

Aspergillus niger, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *T. longibrachiatum* e *T. koningii* têm sido utilizados como fontes industriais de xilanases comerciais. No entanto, as xilanases comerciais também podem ser obtidas por bactérias, por exemplo, a partir de *Bacillus* sp. Industrialmente, as xilanases têm importância nos segmentos de fabricação de papel, alimentação animal, panificação, indústrias de suco

e vinho ou produção de xitol¹¹⁹. As xilanases fúngicas possuem maior interesse em relação às bacterianas, uma vez que são secretadas no meio extracelular, facilitando, assim, sua recuperação do meio de cultivo¹²².

A dificuldade na degradação da lignina consiste na sua complexidade estrutural, seu elevado peso molecular e sua insolubilidade. Enzimas extracelulares, oxidativas e inespecíficas, que podem liberar produtos altamente instáveis e que ainda sofrem várias reações diferentes, catalisam a oxidação no início da despolimerização da lignina. Essa oxidação não específica da lignina tem sido denominada “combustão enzimática”¹²¹.

Há algumas enzimas que fazem a degradação eficaz do polímero de lignina, especificamente: manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), lacase, glicol-oxidase, oxidase de açúcar, álcool oxidase e quinona oxidoreductase¹²³. MnP e LiP oxidam o substrato por meio de dois passos consecutivos de oxidação de apenas um elétron por vez com a formação de radicais catiônicos intermediários, e possuem um elevado valor de potencial redox. Lacases são oxidases que catalisam a oxidação de um elétron de compostos fenólicos e outros substratos não fenólicos ricos em elétrons¹²¹. Níveis elevados de oxigênio aumentam a taxa de biodegradação da lignina através da produção de H_2O_2 como o oxidante extracelular e a indução subsequente de atividade ligninolítica¹⁰⁶.

Enzimas ligninolíticas tem diversas aplicações biotecnológicas potenciais, dentre os quais podemos citar: indústria de alimentos (remoção de compostos fenólicos de alimentos e da cerveja, fonte natural de aromas); indústria de polpa e papel (despolimerização da lignina, deslignificação da polpa e branqueamento de polpa Kraft); indústria têxtil (degradação de corantes e branqueamento); biorremediação (biodegradação de xenobióticos); síntese orgânica; aplicações médicas, farmacológicas, em cosméticos e em nanotecnologia (produção de polímeros, biossensores, síntese de compostos funcionais, entre outros)¹²⁴.

8.6 PRODUTOS OBTIDOS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

8.6.1 Lignina

Atualmente a valorização da lignina representa um desafio real, já que todo ano mais de 50 milhões de toneladas de lignina são coproduzidas na indústria de papel e queimadas para fornecer energia nesse campo de

atividade. Porém, uma parte dessa lignina pode ser usada para outras aplicações sem prejuízo à indústria do papel¹²⁵.

Dentre os usos da lignina temos os adesivos, resinas fenol-formaldeídos e resinas epóxi¹²⁶. No caso do uso como adesivos, muito esforço tem sido feito para trocar o fenol por lignina ou tanino, com base na similaridade das estruturas¹²⁷. Tradicionalmente utilizam-se adesivos termofixos em placas de fibra de madeira de média densidade (*medium density fiberboard* – MDF) e em *particle boards*, principalmente formados por ureia-formaldeído, melamina-ureia-formaldeído e fenol-formaldeído. Esses componentes são derivados do petróleo. Alternativamente, a lignina pode ser utilizada como capa na produção de MDF¹²⁶.

Adesivos fenol-formaldeídos (ou resinas) são extensivamente usados na indústria da madeira pela alta performance incluindo altas forças de ligação, excelente resistência à água, resistência ao calor e estabilidade química¹²⁸. O uso da resina lignina-fenol-formaldeído como adesivo em madeiras tem sido relatado em muitos artigos. Porém, há pouco sucesso no uso dessas resinas na indústria principalmente por razões técnicas e econômicas. Há duas maneiras principais de se preparar a resina: na primeira, a lignina é purificada e modificada para obter produtos puros e ativos. A segunda via é chamada de *catch all*, na qual se utiliza toda a lignina bruta sem purificação¹²⁷. Resinas epóxi também são preparadas de materiais lignocelulósicos e são conhecidas por serem importantes polímeros termofixos, usados em adesivos, compósitos e elastômeros¹²⁹.

8.6.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses além de conter desoxiaçúcares e ácidos urônicos, dependendo da espécie vegetal em questão, e correspondem a 10% a 40% da matéria seca dos resíduos lignocelulósicos. Essa fração pode ser convertida em açúcares monoméricos, principalmente xilose, em temperaturas abaixo de 200 °C na presença de ácidos diluídos¹³⁰.

O principal componente da fração de hemicelulose de madeiras duras e dos resíduos agroindustriais é a xilana, polissacarídeo amorfo, formado por unidades de xilose e que pode ser hidrolisado a esse açúcar pela ação de ácidos em temperaturas brandas¹³¹. O resíduo sólido resultante da hidrólise ácida contém as frações de lignina e de celulose que podem ser separadas e utilizadas de maneiras diversas. A fase líquida resultante da hidrólise ácida

contém o açúcar solúvel e pode ser utilizada como fonte de carbono em processos fermentativos como o da produção de xilitol¹³².

A xilose da hemicelulose também pode ser convertida em furfural, que é um dos insumos para a produção do *nylon 6*¹³³, além de poder ser usado no refino de óleos de motores.

8.6.3 Açúcares

Bagaço de cana pré-processado termicamente em meio ácido produz como resíduo líquido licor de pentoses e hexoses da hidrólise da hemicelulose, que pode ser fermentado em etanol de segunda geração. A composição desse resíduo líquido varia com o tipo de processo de pré-tratamento utilizado, mas é composto basicamente por constituintes de lignina, mono e oligossacarídeos de hemicelulose e xilose, que é o principal carboidrato presente¹³⁴.

A glicose se decompõe rapidamente quando em água supercrítica a 246 bar e de 425 °C a 600 °C, e gera uma diversa gama de produtos, dos quais os principais são ácido acético, acetnilacetona, ácido propenóico, acetaldeído, monóxido de carbono, dióxido de carbono, metano, etano, etileno e hidrogênio¹³⁵.

8.6.4 Etanol

O aumento da preocupação com a emissão de CO₂ e a limitada disponibilidade futura de recursos de petróleo têm aumentado o interesse na energia e combustível baseado em recursos renováveis¹³⁶. A biomassa lignocelulósica é ainda considerada por muitos como a única fonte de carbono não fóssil, em larga escala, atualmente disponível. Muitas pesquisas têm sido realizadas quanto à viabilidade industrial e econômica da conversão da biomassa em energia, combustível, químicos e materiais.

Contrariamente aos combustíveis fósseis, o etanol é uma fonte de energia produzida através da fermentação de açúcares¹³⁷. A bioconversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis e outros produtos químicos está ganhando interesse pelo baixo custo, por ser matéria-prima renovável e pela alta disponibilidade na natureza¹³⁸.

Hoje, os insumos utilizados para a produção de etanol são os açúcares de cana-de-açúcar e de beterraba, ou o amido encontrado nos grãos de cereais.

Nos Estados Unidos e no Canadá, o milho é o insumo dominante usado pela indústria de etanol¹³⁹.

A fermentação alcoólica eficiente de hidrolisado de lignocelulósicos requer que o micro-organismo utilizado fermente os açúcares, hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) na presença de compostos inibitórios, incluindo ácidos fracos, furaldeídos e fenólicos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que tem sido o organismo preferido para produção de etanol fermentativo, é tolerante aos inibidores presentes nos lignocelulósicos, mas não possui a habilidade de utilizar as pentoses, xilose e arabinose¹⁴⁰.

Singh et al.¹⁴¹ obtiveram uma produção de 0,42 g de etanol/g casca de arroz com uma cocultura de *S. cerevisiae* e *Sheffersomyces stipitis* e 50 g/L de concentração de açúcares, principalmente glicose e xilose.

8.7 CONCLUSÕES

Materiais e resíduos lignocelulósicos agroindustriais são potencialmente a alternativa mais viável para a substituição parcial do petróleo e seus derivados. A lignocelulose é uma matéria-prima produzida por fotossíntese, ao contrário do petróleo, e está presente em todos os tipos de biomassa produzida, em qualquer centímetro quadrado de terra fértil onde houver disponibilidade de água e incidir luz solar.

Inseridos na matriz energética de povos e países desde épocas mais remotas, quando a simples queima da madeira era feita com o objetivo de gerar energia térmica, esse material têm hoje utilizações mais nobres, graças ao desenvolvimento científico em vários campos do conhecimento. Através de um processamento termoquímico adequado, os resíduos lignocelulósicos podem se transformar em uma fonte de açúcares, que são matérias-primas essenciais para inúmeros processos biotecnológicos. Por fermentação, com os nutrientes devidamente balanceados e um micro-organismo adequado, é possível produzir uma infinidade de produtos bioquímicos, incluindo enzimas, ácidos orgânicos, biocombustíveis, proteína unicelular, insumos e intermediários para a síntese de outros produtos poliméricos, com várias aplicações industriais.

8.8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para viabilizar o uso adequado e racional dos materiais lignocelulósicos, muitas pesquisas ainda são necessárias para se definir o melhor processamento desse material estável e recalcitrante. As potencialidades de tal material justificam as inúmeras pesquisas e investimentos que estão sendo feitos em todo o mundo por entidades públicas e privadas.

A definição do melhor processo de pré-tratamento é imprescindível para recuperar com o máximo rendimento possível as três frações majoritárias constituintes do material lignocelulósico, considerando ainda a menor degradação dessas e a baixa geração de compostos tóxicos, bem como danos ambientais de qualquer natureza.

REFERÊNCIAS

1. Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010;51(7), 1412-21.
2. Hamelinck CN, Hooijdonk GV, Faaij AP. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short- middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* 2005;28(4):384-410.
3. Rabelo SC, Carrere H, Maciel Filho R, Costa C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 2011;102(17):7887-95.
4. Dias MOS, Junqueira TL, Cavalett O, Pavanello LG, Cunha MP, Jesus CDF, Bonomi A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Applied Energy*. 2013;109:72-8.
5. Pessoa Jr. A, Klikikian BV. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. São Paulo: Ed. Manole; 2005.
6. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):4851-61.
7. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzaple M, Ladisch M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005;96:673-86.
8. Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzaple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 2005;96:1959-66.
9. Haghghi M, Sohrab et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013;27:77-93.
10. Grzegorz B, Cybulska I, Rosentrater K. Integration of extrusion and clean fractionation processes as a pre-treatment technology for prairie cordgrass. *Bioresource Technology*. 2013;135:672-82.
11. Chandra RP, et al. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2007;108(5):67-93.
12. Boullanger E. *Distillerie agricole et industrielle* [Internet]. Paris: J. P. Baillièrre et Fils; 1924. [Cited 2013 Nov 26] Available from: http://www.green-trust.org/2000/biofuel/wood_alc.pdf.
13. Silva FV. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. *Revista Liberato*. 2012;13(20):1-134.

14. Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. 2012;30:1458-80.
15. Sukhbaatar B, Hassan EB, Kim M, Steele P, Ingram L. Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*. 2014;101:196-202.
16. Yuan TQ, You TT, Wang W, Xua F, Sun RC. Synergistic benefits of ionic liquid and alkaline pretreatments of poplar wood. Part 2: Characterization of lignin and hemicelluloses. *Bioresource Technology*. 2013;136:345-50.
17. Jiang H, Chen Q, Ge J, Zhang Y. Efficient extraction and characterization of polymeric hemicelluloses from hybrid poplar. *Carbohydrate Polymers*. 2014;101:1005-12.
18. Peng F, Peng P, Xu F, Sun RC. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*. 2012;30:879-903.
19. Kang S, Li X, Fan J, Chang J. Hydrothermal conversion of lignin: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013;27:546-58.
20. Cardona CA, Quintero, JA, Paz IC. Production of bioethanol from the sugar cane bagasse: Status and Perspectives. *Bioresource Technology*. 2010;101:4754-60.
21. Jeffries TW. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*. 1990;1:163-76.
22. Delmer DP, Amor Y. Cellulose biosynthesis. *The Plant cell*. 1995;7:987-1000.
23. Lora JS, Glasser WG. Recent Industrial applications of lignin: A sustainable alternative to Nonrenewable materials. *Journal of Polymers Environment*. 2002;10:39-48.
24. Kadla JK, Kubo S, Venditti RA, Gilbert RD, Compere AL, Griffith W. Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. *Carbon*. 2002;40:2913-20.
25. Kadam KL, Forrest LH, Jacobson WA. Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass and Bioenergy*. 2000;18:369-89.
26. Cerqueira DA, Rodrigues-Filho G, Meireles CS. Optimization of sugarcane bagasse acetylation. *Carbohydrate Polymers*. 2007;69:579-82.
27. Rodrigues-Filho G, Ribeiro SD, Meireles CS, Silva LG, Ruggiero R, Junior MFF, Cerqueira DA, Assunção RMN, Zeni M, Polleto P. Release of doxycycline through cellulose acetate symmetric and asymmetric membranes produced from recycled agroindustrial residue: Sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*. 2011;7:566-71.
28. Luz SM, Del Tio J, Rocha GJM, Gonçalves AR, Del'arco Jr AP. Cellulose and cellulignin from sugarcane bagasse reinforced polypropylene composites: Effect of acetylation on mechanical and thermal properties. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2008;39:1362-9.

29. Cerqueira DA, Valente AJM, Rodrigues Filho G, Burrows HD. Synthesis and properties of polyaniline-cellulose acetate blends: The use of sugarcane bagasse waste and the effect of the substitution degree. *Carbohydrate Polymers*. 2009;78:402-8.
30. Corradini E, Ito EN, Marconcini JM, Rios CT, Agnelli JAM, Mattoso LHC. Interfacial behavior of composites of recycled poly(ethylene terephthalate) and sugarcane bagasse fiber. *Polymer Testing*. 2009;28:183-7.
31. Mulinari DR, Voorwald JCH, Cioffi MOH, Silva MLCP, Cruz TG, Saron C. Sugarcane bagasse cellulose/HDPE composites obtained by extrusion. *Composites Science and Technology*. 2009;69:214-9.
32. Carrasco C, Baudel HM, Sendelius J, Modig T, Roslander C, Galbe M, Hahn-Hägerdal B, Zacchi G, Lidén G. SO₂-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010;46:64-73.
33. Dias MOS, Modesto M, Ensinas AV, Nebra SA, Filho RM, Rossell CEV. Improving bioethanol production from sugarcane: evaluation of distillation, thermal integration and cogeneration systems. *Energy*. 2011;36:3691-703.
34. Soares IB, Travassos JA, Baudel HM, Benachour M, Abreu CAM. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*. 2011;33:670-5.
35. Cunha MAA, Silva SS, Carvalho W, Santos JC. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. *Semina: Ciências Agrárias*. 2005;26:61-70.
36. Jorapur R, Rajvanshi AK. Development of a sugarcane leaf gasifier for electricity generation. *Biomass and Bioenergy*. 1995;8:91-8.
37. Silva AS, Inoue H, Endo T, Yano S, Bon ESP. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2010;101:7402-9.
38. Park J, Shiroma R, Al-Haq MI, Zhang Y, Ike M, Arai-Sanoh Y, Ida A, Kondo M, Tokuyasu K. A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw – Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. *Bioresource Technology*. 2010;101:6805-11.
39. Gonçalves AR, Moriya RY, Oliveira LRM, Saad MBW. Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;43:157-63.
40. Saad MBW, Oliveira LRM, Cândido RG, Quintana G, Rocha GJM, Gonçalves AR. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;43:220-5.
41. Huang G, Shi JX, Langrish TAG. NH₄OH-KOH pulping mechanisms and kinetics of rice straw. *Bioresource Technology*. 2007;98:1218-23.

42. Rodríguez A, Sánchez R, Requejo A, Ferrer A. Feasibility of rice straw as a raw material for the production of soda cellulose pulp. *Journal of Cleaner Production*. 2010;18:1084-91.
43. Hedjazi S, Kordsachia O, Patt R, Latibari AJ, Tschirner U. Alkaline sulfite–anthraquinone (AS/AQ) pulping of wheat straw and totally chlorine free (TCF) bleaching of pulps. *Industrial Crops and Products*. 2009;29:27-36.
44. Li Z, Liu Y, Liao W, Chen S, Zemetra RS. Bioethanol production using genetically modified and mutant wheat and barley straws. *Biomass and Bioenergy*. 2011;35:542-8.
45. Wan C, Li Y. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology*. 2010;101:6398-403.
46. Zhong W, Zhang Z, Qiao W, Fu P, Liu M. Comparison of chemical and biological pretreatment of corn straw for biogas production by anaerobic digestion. *Renewable Energy*. 2011;36:1875-9.
47. Goelzer FDE, Faria-Tischer PCS, Vitorino JC, Sierakowski MR, Tischer CA. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed Rice bark. *Materials Science and Engineering C*. 2009;29:546-51.
48. Stradiotto NR, Lemos EGM. Resíduos agrícolas e agroindustriais: potencialidades de uso na produção de etanol. In: *Bioenergia*. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Capítulo 10.
49. Sanderson K. Lignocellulose: A chewy problem. *Nature*. 2011;474:12-4.
50. MAPA [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Dados Básicos de Economia Agrícola. 2013 Oct. Available from: [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Pasta%20de%20Outubro%20\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Pasta%20de%20Outubro%20(1).pdf).
51. CONAB [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Acompanhamento da safra brasileira. 2013. Available from: http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos.
52. Huang CF, Ting-Hsiang L, Gia-Luen G, Wen-Song H. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. 2009;100(17):3914-20.
53. Panagiotopoulos IA, Bakker RR, De Vrije T, Koukios EG. Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. *Bioresource Technology*. 2011;102(24):11204-11.
54. Kim JS, Won IC, Minsu K, Ji YP, Jin-Suk L. Kinetic study of empty fruit bunch using hot liquid water and dilute acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012;167(6):1527-39.
55. Saha BC, Iten LB, Cotta MC, Wu YV. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. 2005;40(12):3693-700.

56. Rahman SH, Choudhury JP, Ahmad L, Kamaruddin H. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. *Bioresource Technology*. 2007;98(3):554-9.
57. Chen WH, Yi-Jian T, Herng-Kuang S. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Applied Energy*. 2011;88(8):2726-34.
58. Zhang D, Ong YL, Li Z, Wu JC. Optimization of dilute acid-catalyzed hydrolysis of oil palm empty fruit bunch for high yield production of xylose. *Chemical Engineering Journal*. 2012;181-182:636-42.
59. Meena K, Kumar V, Vijay VK, Malik A. Analysis of different techniques used for improvement of biomethanation process: A review. *Fuel*. 2013;106:1-9.
60. Ziyu W, Keshwani DR, Redding AP, Cheng JJ. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technology*. 2010;101(10):3583-5.
61. Haghighi MHS, Hossein Golfeshan A, Tabatabaei M, Salehi Jouzani G, Najafi GH, Gholami M, Ardjmand M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013;27:77-93.
62. Moradi F, Amiri H, Soleimanian-Zad S, Ehsani MR, Karimi K. Improvement of acetone, butanol and ethanol production from rice straw by acid and alkaline pretreatments. *Fuel*. 2013;112:8-13
63. Rocha GJM, Gonçalves R, Oliveira BR, Olivares EG, Rossell CEV. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2012;35(1):274-9.
64. Subhedar PB, Gogate PP. Alkaline and ultrasound assisted alkaline pretreatment for intensification of delignification process from sustainable raw-material. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014;21(1):216-25.
65. Wei WB, Li L, Chang L, Wang Z. Chemical and structural characterization of alkaline-extractable hemicelluloses from various eucalyptus species. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013;130(4):2390-8.
66. William EK, Holtzapple MT. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy*. 2000;18:189-99.
67. Ko JK, et al. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. *Bioresource Technology*. 2009;100(19):4374-80.
68. Xuan L, Kim TH. Low-liquid pretreatment of corn stover with aqueous ammonia. *Bioresource technology*. 2011;102(7):4779-86.

69. Jung YH, Kim IJ, Han J-I, Choi I-G, Kim KH. Aqueous ammonia pretreatment of oil palm empty fruit bunches for ethanol production. *Bioresource Technology*. 2011;102(20):9806-9.
70. Peng F, Peng P, Xu F, Sun R-C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*. 2012;30(4):879-903.
71. Brienzo M, Siqueira F, Milagres MF. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;46(2):199-204.
72. Hosseini SA, Shah N. Multiscale modelling of hydrothermal biomass pretreatment for chip size optimization. *Bioresource technology*. 2009;100(9):2621-8.
73. Martín-Sampedro R, Eugenio ME, García JC, Lopez F, Villar JC, Diaz MJ. Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of Eucalyptus globulus. *Biomass and Bioenergy*. 2012;42:97-106.
74. Martin-Sampedro R, Eugenio ME, Revilla E, Martín JA, Villar JC. Biorefinery by the addition of a steam explosion. *bioresources.com*. 2011;6:513-28.
75. Baharuddin AS, Sulaiman A, Kim DH, Mokhtar MN, Hassan MA, Wakisaka M, Nishida H. Selective component degradation of oil palm empty fruit bunches (OPEFB) using high-pressure steam. *Biomass and Bioenergy*. 2013;1-8.
76. Cara C, Ruiz E, Ballesteros I, Negro MJ, Castro E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry*. 2006;41(2):423-9.
77. Chang J, Cheng W, Yin Q, Zuo R, Song A, Zheng Q, Liu J. Effect of steam explosion and microbial fermentation on cellulose and lignin degradation of corn stover. *Bioresource Technology*. 2012;104:587-92.
78. Datar R, Huang J, Maness P, Mohagheghi A, Czernik S, Chornet E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007;32(8):932-9.
79. Ruiz E, Cara C, Manzanares P, Ballesteros M, Castro E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;42(2):160-6.
80. Chen WH, Pen BL, Yu CT, Hwang WS. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011;102(3):2916-24.
81. Chiaramonti D, Prussi M, Ferrero S, Oriani L, Ottonello P, Torre P, Cherchi F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*. 2012;46:25-35.
82. Kovacs K, Macrelli S, Szakacs G, Zacchi G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnology for Biofuels*. 2009;2:14.

83. Liu ZH, Qin L, Pang F, Jin MJ, Li BZ, Kang Y, Yuan YJ. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Industrial Crops and Products*. 2013;44:176-84.
84. Shamsudin S, Md Shah UK, Zainudin H, Abd-Aziz S, Mustapa Kamal SM, Shirai Y, Hassan MA. Effect of steam pretreatment on oil palm empty fruit bunch for the production of sugars. *Biomass and Bioenergy*. 2012;36:280-8.
85. Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. 2011;29(6):675-85.
86. Laser M, Schulman D, Allen SG, Lichwa J, Antal MJ, Lynd LR. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*. 2002;81(1):33-44.
87. Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. 2012;37(1):19-27.
88. Wan C, Li Y. *Bioresource Technology* Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks. *Bioresource Technology*. 2011;102(20):9788-93.
89. Allen SG, Schulman D, Lichwa J, Antal MJ, Laser M, Lynd LR. A Comparison between Hot Liquid Water and Steam Fractionation of Corn Fiber. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2001;40(13):2934-41.
90. Hongdan Z, Shaohua X, Shubin W. Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. *Bioresource Technology*. 2013;143: 391-6.
91. Pérez JA, Ballesteros I, Ballesteros M, Sáez F, Negro MJ, Manzanares P. Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*. 2008;87:3640-7.
92. Yu Q, Zhuang X, Yuan Z, Wang Q, Qi W, Wang W, Xu H. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):4895-9.
93. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 2011;52(2):858-75.
94. Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. 2012;37(1):19-27.
95. Bals B, Wedding C, Balan V, Sendich E, Dale B. *Bioresource Technology* Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource Technology*. 2011;102(2):1277-83.
96. Lee JM, Jameel H, Venditti RA. *Bioresource Technology* A comparison of the autohydrolysis and ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatments on the subsequent enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technology*. 2010;101(14):5449-58.

97. Wu-haan W. Evaluation of ultrasonic pretreatment on anaerobic digestion of biomass for methane production. Ames: Iowa State University; 2008.
98. Ninomiya K, Kamide K, Takahashi K, Shimizu N. Enhanced enzymatic saccharification of kenaf powder after ultrasonic pretreatment in ionic liquids at room temperature. *Bioresource Technology*. 2012;103(1):259-65.
99. Yunus R, Salleh SF, Abdullah N, Biak DRA. Effect of ultrasonic pre-treatment on low temperature acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch. *Bioresource Technology*. 2010;101(24):9792-6.
100. Velmurugan R, Muthukumar K. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production: optimization through response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2012;112:293-9.
101. Sánchez OJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 2008;99:5270-95.
102. Mtui GYS. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology*. 2009;8(8):1398-1415.
103. Howard RL, Abotsi EL, Howard S. Lignocellulose biotechnology : issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2003;2(12): 602-19.
104. Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, et al. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 1999;27(2-3):175-85.
105. Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresource Technology*. 2002;83:1-11.
106. Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 2009;27(2):185-94.
107. Moyson E, Verachtert H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991:421-4.
108. Taniguchi M, Suzuki H, Watanabe D, et al. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;100(6):637-43.
109. Dias AA, Freitas GS, Marques GSM, et al. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresource Technology*. 2010;101(15):6045-50.
110. Arora A, Nain L, Gupta JK. Solid-state fermentation of wood residues by *Streptomyces griseus* B1, a soil isolate, and solubilization of lignins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005;21(3):303-8.
111. Hashimah N, Rahman A, Aini N, Aziz SA, Hassan MA. Production of Ligninolytic Enzymes by Newly Isolated Bacteria from Palm Oil Plantation Soils. 2013;8:6136-50.

112. Bandounas L, Wierckx NJ, De Winde JH, Ruijsenaars HJ. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnology*. 2011;11(1):94.
113. Wang W, Yuan T, Wang K, Cui B, Dai Y. Combination of biological pretreatment with liquid hot water pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of *Populus tomentosa*. *Bioresource Technology*. 2012;107:282-6.
114. Taniguchi M, Takahashi D, Watanabe D, et al. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2010;110(4):449-52.
115. Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. 2007:119-34.
116. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. A review. *Energy Conversion and Management*. 2011;52(2): 858-75.
117. Zhang YHP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;88(7):797-824.
118. Hildén L, Johansson G. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology Letters*. 2004;26(22):1683-93.
119. Gírio FM, Fonseca C, Carneiro F, et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):4775-800.
120. Malherbe S, Cloete TE. Lignocellulose biodegradation : Fundamentals and applications. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*. 2002;(1):105-14.
121. De Alencar Guimaraes NC, Sorgatto M, Peixoto-Nogueira SDC, et al. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. *SpringerPlus*. 2013;2(1):380.
122. Pérez J, Muñoz-Dorado J, De La Rubia T, Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*. 2002;5(2): 53-63.
123. Sarikaya A, Ladisch MR. Mechanism and potential applications of bio-ligninolytic systems in a CELSS. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1997;62(2-3):131-49.
124. Maciel MMJ, Castro E Silva A, Telles Ribeiro HC. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2010;13(6):1-13.
125. Joffres B, et al. Catalytic Hydroconversion of a wheat straw soda lignin: Characterization of the products and the lignin residue. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2014;145:167-76.
126. Seyed HG, Mizi F. Lignin in straw and its applications as an adhesive. *International Journal of Adhesion & Adhesives*. 2014;48:92-101.

127. Zhang W, Ma Y, Xu Y, Wang C, Chu F. Lignocellulosic ethanol residue-based lignin-phenol-formaldehyde resin adhesive. *International Journal of Adhesives & Adhesives*. 2013;40:11-18.
128. Jin Y, Cheng C, Zheng Z. Preparation and characterization of phenol-formaldehyde adhesives modified with enzymatic hydrolysis lignin. *Bioresource Technology*. 2010;101:2046-8.
129. Hirose S, Hatakeyama T, Hatakeyama H. Novel Epoxy Resins Derived from Biomass Components. *Procedia Chemistry*. 2012;4:26-33.
130. Neureiter M, et al. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002;98:49-58.
131. Bier MCJ, et al. Crescimento e consumo de Xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. *Evidência*. 2007;7:119-30.
132. Parajó JC, Dominguez HD, Domingues JM. Biotechnological Production of Xylitol. Part 3: Operation in Culture Media Made From Lignocellulose Hydrolysates. *Bioresource Technology*. 1998;66:25-40.
133. Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C, Murali N. Biorefineries: Current Status, Challenges and Future Direction. *Energy & Fuels*. 2007;20:1727-37.
134. Canilha L, et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012; Article ID 989572, 15 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/989572>
135. Holgate HR, et al. Glucose hydrolysis and oxidation in supercritical water. *AIChE J*. 2004;41(3):637-48.
136. Moe ST, Janga KK, Hertzberg T, Hägg MB, Øyaas K, Dyrset N. Saccharification of lignocellulosic biomass for biofuel and biorefinery applications – A renaissance for the concentrated acid hydrolysis? *Energy Procedia*. 2012;20:50-8.
137. Sun T, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002;83:1-11.
138. Sudiyani Y, et al. Utilization of biomass waste empty fruit bunch fiber of palm oil for bioethanol production using pilot – scale unit. *Energy Procedia*. 2013;32:31-8.
139. Mabee WE, McFarlane PN, Saddler JN. Biomass availability for lignocellulosic ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2011;35:4519-29.
140. Viikari L, Vehmannperä J, Koivula A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Energy*. 2012;46:13-24.
141. Singh A, Bajar S, Bishnoi NR. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. *Fuel*. 2014;116:699-702.

COGUMELOS: UMA FONTE PROMISSORA DE COMPOSTOS ATIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOPRODUTOS FARMACÊUTICOS E NUTRACÊUTICOS

Carlos Ricardo Soccol
Francisco Menino Destéfanis Vítola
Rosália Rubel
Margarete Kimie Falbo
Luiz Alberto Junior Letti
Marcelo Bellettini
Vanete Thomaz Soccol

9.1 INTRODUÇÃO

Existe grande diversidade de macromicetos no mundo, e a rica variedade de formas e cores que eles apresentam se reflete na diversidade de estruturas moleculares que os compõem. Alguns cogumelos são comestíveis, outros, ou

não apresentam características organolépticas agradáveis ou são tóxicos. Algumas espécies produzem substâncias alucinógenas e outras produzem substâncias potencialmente letais, outras ainda contêm importantes substâncias que podem ser usadas para fins medicinais, capazes de curar ou tratar as mais diversas enfermidades^{1,2}.

Alguns dos benefícios proporcionados pelos cogumelos podem ser obtidos simplesmente incluindo cogumelos comestíveis e produtos derivados na alimentação³. Outra possibilidade é a adição de extratos de cogumelos ricos em substâncias ativas como suplemento em alimentos, como massas, bebidas, cereais, gelatinas e temperos. Esses alimentos com propriedades funcionais, denominados nutracêuticos⁴, contendo cogumelos e/ou substâncias derivadas apresentam um grande potencial de mercado, ainda quase totalmente inexplorado no Brasil⁵⁻⁷.

O emprego de cogumelos medicinais para o preparo de fármacos requer a identificação e purificação de compostos ativos. Trata-se de um campo já relativamente desenvolvido na Ásia, Europa e América do Norte, que representa um potencial estratégico para o Brasil, levando-se em conta a admirável biodiversidade nacional de cogumelos^{8,9}. Em todo o país observa-se um crescimento no número de pesquisadores e de laboratórios envolvidos em variadas etapas de pesquisa, desde o levantamento da biodiversidade e isolamento de novas espécies até a avaliação de propriedades farmacológicas, identificação e caracterização molecular de princípios ativos.

Neste capítulo estão descritos alguns exemplos de atividades farmacológicas de substâncias produzidas por cogumelos, com base em relatos amplamente documentados na literatura científica, incluindo atividades antimicrobianas e antiparasitárias, imunomoduladoras e antitumorais, prevenção/tratamento de doenças cardiovasculares e como agentes antioxidante. Também incluímos uma revisão geral dos fundamentos científicos e desenvolvimentos técnicos ao longo da história, além de breves revisões acerca de três importantes espécies de cogumelos medicinais: *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps militaris* e *Agaricus subrufescens*. Como exemplo de aplicação técnica, destacamos a produção de polissacarídeos bioativos a partir de cultivos miceliais, por ser uma classe de substâncias bem estudada e por já existirem produtos no mercado mundial com base nessa tecnologia. Um protocolo para produção e recuperação, em escala laboratorial, de exopolissacarídeos a partir do cultivo micelial submerso de *G. lucidum* é apresentado, assim como um método analítico para estimar a produtividade do processo, de modo a fornecer subsídios para realizar experimentos de otimização da produção e da recuperação/purificação.

Muitas perspectivas emergem quanto ao futuro da biotecnologia de macromicetos no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e nutracêuticos. Espera-se que o presente capítulo contribua para esse objetivo, difundindo informações que estimulem novas pesquisas, direcionadas para a geração de novos e melhores medicamentos e alimentos funcionais, com vistas à manutenção e promoção da saúde e qualidade de vida da população.

9.2 FUNGOS/COGUMELOS: ASPECTOS GERAIS E BIOLOGIA

Os fungos são um grupo de organismos distinto dos vegetais e dos animais, porém evolutivamente mais próximos dos vegetais e dos animais que de qualquer outro grupo de organismos. Os fungos apresentam quitina (comum em insetos) e glucanas (comuns em vegetais) na composição das suas paredes celulares. Em geral, crescem fixos sobre substrato nutritivo, como os vegetais, porém, diferentemente dos vegetais, os fungos não apresentam clorofila, e dessa forma não são capazes de realizar fotossíntese. Retiram a energia e o material que precisam para se desenvolver da digestão de matéria orgânica. São, portanto, heterotróficos, como os animais. Podem apresentar o papel ecológico de decompositores, parasitas, comensais ou simbioses^{8,10}.

Existem fungos unicelulares, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada há milênios pela humanidade para produzir pão, cerveja e vinho. Esses organismos são também o ponto de partida para a fabricação de bebidas destiladas e de etanol combustível. Outros fungos são multicelulares e formam redes de filamentos. Cada filamento, formado por células alongadas, é denominado hifa. Uma rede de hifas se denomina micélio. Os fungos filamentosos podem se reproduzir de maneira assexuada, pela fragmentação das hifas ou por reprodução sexuada ou assexuada, pela produção de esporos. Alguns dos fungos filamentosos produzem esporos em estruturas microscópicas. Outros são capazes de formar corpos de frutificação macroscópicos, que são tecnicamente chamados carpóforos e popularmente conhecidos como cogumelos (Figura 9.1). Tais fungos são cientificamente denominados macromicetos ou macrofungos⁸.

O ciclo de vida dos cogumelos pode ser dividido em pelo menos três fases: esporo, micélio e corpo de frutificação, também chamado carpóforo (Figura 9.2). Dadas as condições adequadas de temperatura, umidade e nutrientes, os esporos germinam, dando origem a estruturas filamentosas, multicelulares, denominadas hifas, que secretam enzimas digestivas e absorvem

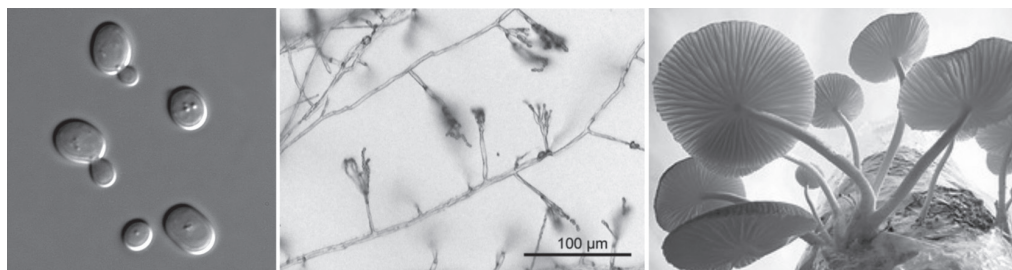


Figura 9.1 Leveduras (esquerda)¹¹, bolor (centro)¹², cogumelos (direita).

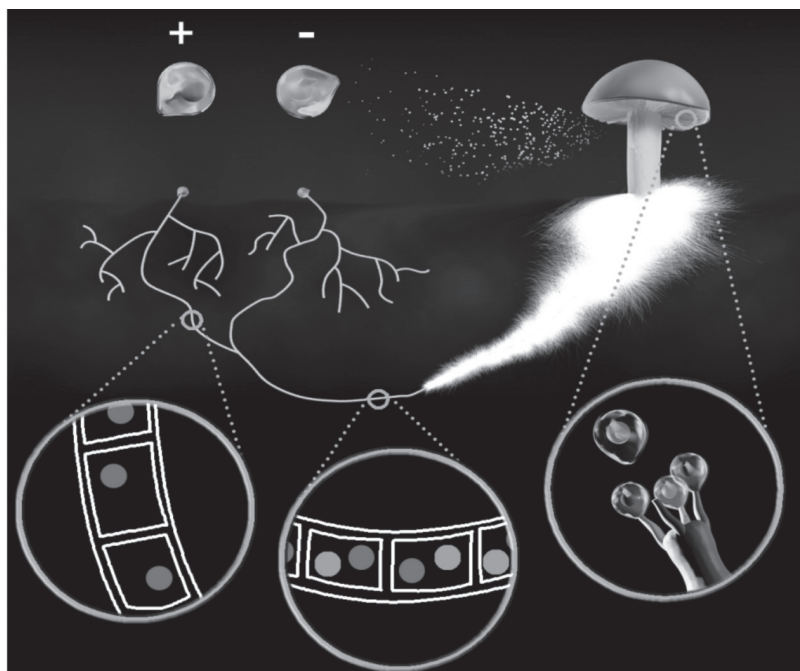


Figura 9.2 Representação esquemática do ciclo de vida dos cogumelos. Ver texto para maiores detalhes.

moléculas do substrato. Um conjunto de hifas é denominado micélio. Cada esporo dá origem ao que se denomina micélio primário (formado por células mononucleadas haploides). Quando micélios primários compatíveis se encontram, pode ocorrer plasmogamia (fusão de células), gerando micélio secundário (células binucleadas, núcleos haploides). O micélio secundário

tem o potencial de gerar corpos de frutificação sob determinadas condições. Nos carpóforos, mais especificamente na região do himênio (lamelas nos champignons, por exemplo), são formadas estruturas (ascos ou basídios) onde ocorrem fenômenos de fusão e recombinação entre os núcleos, gerando novos esporos e fechando o ciclo (Figura 9.2).

Cogumelos decompositores primários (por exemplo, *Lentinus* spp. e *Pleurotus* spp.) são capazes de degradar e assimilar uma imensa variedade de moléculas orgânicas, podendo ser cultivados em substratos que incluem: serragem, cepilho, lascas e toras de madeira, palhas, bagaços, farelos, cascas, grãos e substratos líquidos, como melaço e milhacina¹³. Já os decompositores secundários, como os *Agaricus* spp. (por exemplo, champignon de Paris e cogumelo-do-sol) necessitam substratos previamente compostados (pré-decompostos por outros micro-organismos)¹⁴. Dessa forma, os cogumelos podem ser utilizados como ferramentas para reciclar resíduos orgânicos¹⁵.

Em relação ao aspecto nutricional, os cogumelos são uma ótima fonte alimentar (Tabela 9.1), e a composição em carboidratos, gorduras, vitaminas varia segundo a espécie e também segundo o substrato utilizado no seu cultivo¹⁶.

Tabela 9.1 Composição físico-química, em peso seco, de cogumelos. Adaptado de Trione e Michaels (1977, apud Yokomizo & Bononi, 1985)¹⁷

| COGUMELO | PROTEÍNA (NX4,38) | CARBOIDRATO TOTAL | GORDURA | FIBRA | VALOR ENERGÉTICO |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|-----------|-------------|---------------------|
| | (%) | (%) | (%) | (%) | (KCAL/100G) |
| <i>Agaricus bisporus</i> | 23,9 a 34,8 | 51,3 a 62,5 | 1,7 a 8,0 | 8,0 a 10,4 | 328 a 381 |
| <i>Auricularia</i> spp. | 4,2 a 7,7 | 79,9 a 87,6 | 0,8 a 9,7 | 11,9 a 19,8 | 347 a 384 |
| <i>Flammulina velutipes</i> | 17,6 | 73,1 | 1,9 | 3,7 | 378 |
| <i>Lentinula edodes</i> | 13,4 a 17,5 | 67,5 a 78,0 | 4,9 a 8,0 | 7,3 a 8,0 | 387 a 392 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | 10,5 a 30,4 | 57,6 a 81,8 | 1,6 a 2,2 | 7,5 a 8,7 | 345 a 367 |
| <i>Volvariella volvacea</i> | 21,3 a 43,0 | 50,9 a 60,0 | 0,7 a 6,4 | 4,4 a 13,4 | 254 a 374 |

Os cogumelos são constituídos, de um modo geral, de 90% de água, elevados teores de proteína, vitaminas (B1 e C), riboflavina, biotina e niacina. Apresentam todos os 21 aminoácidos essenciais, sendo ricos em sais minerais e fibras de baixo valor calórico (30 cal/100 g de cogumelo)¹⁸. Descobriu-se também que são capazes de produzir vitamina D, quando brevemente expostos ao sol¹⁹.

Mais de duas mil espécies de cogumelos são reconhecidas como comestíveis. Sabe-se que outras dezenas produzem substâncias alucinógenas, como a psilocibina (cogumelos do gênero *Psilocybe*) e a muscarina (*Amanita muscaria*)^{20,21} (ver Figura 9.3). Além disso, existem dezenas de espécies potencialmente letais. Como exemplo, pode ser citado que alguns miligramas por quilograma de massa corpórea da substância alfa amanitina, produzida por *Amanita phalloides* (o chapéu-da-morte) e *Galerina marginata*, podem levar um indivíduo saudável a óbito²² (ver Figura 9.4). Contudo, há espécies de macromicetos que contêm importantes substâncias medicinais^{2,23}.



Figura 9.3 Exemplos de macromicetos que produzem substâncias alucinógenas. *Psilocybe cubensis* (esquerda)²⁴ e *Amanita muscaria* (direita).

Exemplos de atividades farmacológicas experimentalmente confirmadas, exibidas por substâncias encontradas em cogumelos, são: hipolipidêmica, antiarterosclerótica^{27,28}, hipocolesterolêmica e diurética (importantes na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares), imunomoduladora (que resulta indiretamente em atividade antitumoral, aumento de resistência a infecções e amenização de reações alérgicas)²⁹, antioxidante³⁰, hepatoprotetora, antiparasitária, anti-inflamatória, antidiabética^{31,32} e moduladora da produção de hormônios^{3,33}.



Figura 9.4 Exemplos de macromicetos que produzem substâncias letais. *Amanita phalloides* (esquerda)²⁵ e *Galerina marginata* (direita)²⁶.

9.3 USO TRADICIONAL E CONFIRMAÇÕES CLÍNICAS

Indícios na literatura e história da humanidade apontam que os seres humanos vêm utilizando cogumelos com finalidades medicinais há vários milênios. Os registros formais mais antigos de propriedades medicinais de cogumelos estão em livros de medicina tradicional chinesa e datam de mais de 2 mil anos³⁴. Porém, há hipóteses de que essa história seja muito mais antiga. Foram encontrados, na fronteira entre a Itália e a Áustria, os restos mortais altamente conservados de um homem, que viveu em meados de 3300 a.C. Esse indivíduo portava uma bolsa com fragmentos de cogumelos de espécies não comestíveis, possivelmente para utilização medicinal³⁵.

Os egípcios destinavam os cogumelos para a alimentação dos nobres, e os romanos os consideravam comida dos deuses³⁶. Algumas religiões antigas, como a de povos astecas gregos, empregavam cogumelos alucinógenos em seus rituais²¹. Povos nativos do Brasil apresentam conhecimentos sobre a utilização alimentícia e medicinal de várias espécies de cogumelos. Os tupis-guaranis utilizam uma espécie de cogumelo chamada *Pycnoporus sanguineus* com finalidades medicinais. Os caingangues incluem a espécie *Pleurotus pulmonarius* na sua alimentação⁹. Os ianomâmis, da Amazônia, conhecem e utilizam várias espécies para finalidades alimentícias e medicinais³⁷.

Apesar de existirem registros antigos do conhecimento e utilização de cogumelos, o cultivo apenas foi viabilizado mais recentemente, na era cristã¹³. Os primeiros cogumelos cultivados foram do gênero *Auricularia*, na China, por volta de 400 d.C.;o domínio do cultivo do shiitake (*Lentinula edodes*), também na China, foi registrado em torno de 600d.C. O champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) apenas começou a ser cultivado em meados de 1600d.C.

Nas últimas décadas, foram desenvolvidas técnicas para o cultivo de dezenas de espécies de cogumelos, inclusive algumas espécies de trufas. Porém, o cultivo de diversas espécies permanece um desafio a ser vencido. Vários fatores são bastante complexos, tais como as interações entre simbioses (árvore/cogumelo, por exemplo) e as relações parasita/hospedeiro (cogumelo/inseto, por exemplo).

A utilização terapêutica milenar de cogumelos e as novas tecnologias de produção motivaram uma série de estudos para avaliar a bioatividade de diversas substâncias produzidas por esses organismos. Muitos artigos científicos confirmaram algumas das propriedades medicinais alegadas pela medicina tradicional¹³⁸⁻⁴⁰.

A Tabela 9.2 mostra resultados obtidos em experimentos clínicos envolvendo substâncias ativas derivadas de cogumelos.

Tabela 9.2 Atividades farmacológicas de substâncias extraídas de cogumelos, confirmadas em testes clínicos

| EFEITO/DOENÇA | SUBSTÂNCIA | ESPÉCIE DE COGUMELO | MECANISMO/ DETALHES | ANO | REFERÊNCIAS |
|--|-----------------------------------|---|---|--------------|-------------|
| Anticâncer (gástrico) | Polissacarídeo K lentinana | <i>Lentinus edodes</i> | Prolongamento da sobrevida em pacientes com metástase | 2009 | 41 |
| Anticâncer (mama) | Extratos aquosos | <i>Agaricus bisporus</i> | Supressão da atividade de aromatase e da proliferação de células tumorais. Diminuição na produção de estrógeno. | 2001 | 42 |
| | Triterpenos hidroxilados | Diversas | Supressão da sinalização Akt/NF-κB | 2008 | 43 |
| Anticâncer (colorectal) | Polissacarídeo K (PSK) | <i>Coriolus versicolor CM-10</i> | Estimula as respostas imunológicas inata e adaptativa | 2007 2006 | 44, 45 |
| | Lectina | <i>A. bisporus</i> (ABL) | Inibe a proliferação de células tumorais humanas <i>in vitro</i> | 1993 | 46 |
| | Extrato aquoso | <i>Inonotus obliquus</i> | Indução da expressão de proteínas pró-apoptóticas e inibição da expressão de proteínas antiapoptóticas | 2009 | 47 |
| | Extrato não especificado | <i>A. blazei</i> Murill <i>Kyowa</i> (AbMK) | Aumento da atividade de células NK. Alívio de efeitos colaterais da quimioterapia | 2004 | 48 |
| Anticâncer (cervical, ovariano, endometrial) | Lingzi Lentinana Clitocinet | <i>Ganoderma lucidium</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Leucopaxillus giganteus</i> | Efeitos antiproliferativos via indução da apoptose | 2010 2008 | 49, 50 |

| EFEITO/DOENÇA | SUBSTÂNCIA | ESPÉCIE DE COGUMELO | MECANISMO/ DETALHES | ANO | REFERÊNCIAS |
|--|--|--|---|--------------|-------------|
| Anticâncer (próstata) | Extrato etanólico | <i>G.lucidum</i> | Melhora o <i>international prostate symptom score</i> (IPSS) de homens com sintomas do trato urinário inferior, via inibição de 5- α -redutase | 2008 | 51 |
| | Extrato não especificado | <i>G. lucidum</i> | Indução da apoptose. Inibição da angiogênese | 2004 2005 | 52, 53 |
| Anticâncer (pancreático — sólido avançado) | Irofulven (citotóxica) | <i>Omphalotus olearius</i> (não comestível) | Atividade antitumoral e efeitos pré-clínicos positivos | 2000 | 54 |
| Imunomodulação | Andosan™ | <i>A. blazei</i> 82%; <i>Hericiu erinaceus</i> 14,7%; <i>Grifola frondosa</i> 2,9% | Aumento na produção de citocinas <i>in vitro</i> Redução na produção de IL-1- β (97%), TNF- α (84%), IL-17 (50%) e IL-2 (46%). Atividade antioxidante <i>in vivo</i> | 2009 | 55 |
| Imunomodulação (hipercolesterolemia) | Alfa-glucanas | <i>A. bisporus</i> | Diminuição na produção de TNF α induzida por lipopolissacarídeos em 69%. Decréscimo na produção de IL-12 e IL-10 <i>in vivo</i> | 2010 | 56 |
| Imunomodulação (câncer) | Glucana | <i>Trametes versicolor</i> | Aumento de sobrevida e funções imunológicas melhoradas | 2010 | 57 |
| Imunomodulação (doenças variadas) | Vários extratos | Várias espécies | Efeitos sobre células NK, macrófagos, células T e produção de citocinas. Ativação de vias mitogênicas por quinases (MAPK) | 2007 | 58 |
| Diabetes (tipo II) | Extrato AbM (com metformina e gliclazida) | <i>A. blazei</i> Murill (AbM) | Aumento da resistência à insulina, devido ao aumento na concentração de adiponectina | 2007 | 59 |
| Doenças cardiovasculares | Extrato não especificado | <i>Pleurotus ostreatus</i> | Redução significativa na pressão sanguínea, glicose sanguínea, colesterol total e triglicérides (<i>in vivo</i>) | 2007 | 60 |
| | Polissacarídeos ligados a proteínas (A-BP e L-PBP) | <i>A. blazei</i> ; <i>Lentinus edodes</i> | Efeito hipolipidêmico e de controle de peso via mecanismo envolvendo absorção de colesterol | 2002 | 61 |
| Saúde mental e cognição | Extrato não especificado | <i>Hericiu erinaceus</i> | Aumento de pontuação em funções cognitivas de pessoas com problemas cognitivos leves | 2009 | 62 |
| | Dilinoleoil-fosfatidiletanolamina (DLPE) | <i>H. erinaceus</i> | Protege contra a morte celular neuronal causada pela toxicidade do peptídeo beta-amiloide (A beta) e estresse oxidativo; aumento de pontuação em funções cognitivas de pessoas com demência | 2008 | 63 |
| | HericenonasC — H; Erinacinas A-I | <i>Hericiu erinaceus</i> | Induz fator de crescimento de nervos (NGF) (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) | 2008 | 63 |
| | | <i>Agarius blazei</i> Murill (AbM) | Decresce concentrações de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, normalizando as funções do fígado de pacientes com hepatite B | 2008 | 64 |
| Hepatite B | Ganopoly® | <i>G. lucidum</i> | Atividades hipoglicêmica, antiviral e protetora do fígado em hepatite crônica | 2005 | 65 |
| Antiviral (HIV) | Farnesil hidroquinona, ganomicina I | <i>G. colossum</i> | Inibição da protease HIV-1 | 2009 | 66 |
| Antiviral (poliomielite) | Polissacarídeos | <i>A. subrufescens</i> (<i>A. brasiliensis</i> , <i>A. blazei</i>) | Age no estágio inicial da replicação viral | 2007 | 67 |

| EFEITO/DOENÇA | SUBSTÂNCIA | ESPÉCIE DE COGUMELO | MECANISMO/ DETALHES | ANO | REFERÊNCIAS |
|---------------|--------------------------|-------------------------|--|------|-------------|
| Asma | Extrato não especificado | <i>Cordyceps</i> sp. | Inibe a proliferação e a diferenciação das células Th2 e reduz a expressão de citocinas, em células mononucleares do sangue periférico. Alivia inflamação crônica por aumentar as concentrações de IL-10 (in vivo) | 2010 | 68 |
| Constipação | Fibra | <i>Auricularia</i> spp. | Atenuam sintomas relacionados à constipação sem efeitos colaterais significativos (in vivo) | 2004 | 69 |

Diversos laboratórios passaram a extrair substâncias bioativas a partir dos cogumelos e a elaborar uma série de produtos alimentícios, medicinais e cosméticos. Técnicas foram desenvolvidas também para produzir moléculas bioativas a partir de massas miceliais cultivadas em substratos sólidos^{70,71} e líquidos, encurtando assim o tempo de fabricação e permitindo mais fácil assepsia e controle dos processos^{5,27,72}. Alguns produtos que incorporam estas tecnologias já estão sendo fabricados e comercializados em vários países. Muitas substâncias derivadas de cogumelos estão em fase de testes clínicos de eficácia e toxicidade em todo o mundo.

A seguir, abordaremos com mais profundidade algumas das mais importantes espécies de cogumelos medicinais utilizadas como fonte de moléculas ativas para produtos farmacêuticos e nutracêuticos, ao longo da história.

9.3.1 Ganoderma lucidum

Ganoderma lucidum é um cogumelo medicinal conhecido e utilizado na China, Japão e Coreia há milênios e figura nos textos mais antigos de medicina tradicional chinesa como um medicamento superior, indicado no tratamento de uma série de enfermidades e sem efeitos colaterais (Figura 9.5). Não apenas propriedades medicinais eram atribuídas a esse cogumelo, mas até mesmo alegria e prosperidade seriam conferidas àqueles que o consumissem. Era um cogumelo relativamente raro de encontrar e, dessa forma, altamente valioso, destinado à nobreza e aos mais ricos.

Shen Nong no seu Pen Ts’ao Jing, um antigo texto medicinal chinês com 2000 anos diz que “o sabor é amargo, a sua energia neutra, não tem toxicidade. Cura a acumulação de fatores patogênicos no peito. É bom para o QI da cabeça, incluindo actividades mentais [...] O consumo em longo prazo deixa o corpo mais leve; nunca envelhecerás. Prolonga os anos”⁷⁴. Um livro médico chinês denominado de *O Bencao Gangmu*, publicado no século XVI, mostra também uma possível ligação entre a pesquisa moderna e o conhecimento popular ao descrever este cogumelo: “Afeta positivamente o QI do



Figura 9.5 *Ganoderma lucidum*⁷³.

coração, reparando a zona peitoral e beneficiando aqueles que têm um peito congestionado. Tomado ao longo de grande período de tempo mantém a agilidade do corpo, e os anos são prolongados [...]”⁷⁵.

O cultivo é atualmente dominado, o que popularizou os produtos derivados e estimulou um grande número de pesquisas ao redor do mundo sobre as diversas propriedades medicinais alegadas pela cultura popular³⁹. Contudo, o preço desse cogumelo continua elevado, o que o torna disponível para poucos. Esta é provavelmente a espécie de cogumelo medicinal mais estudada no mundo até hoje. Sabe-se que algumas substâncias produzidas por *G. lucidum* apresentam marcantes efeitos farmacológicos, com destaque para polissacarídeos e triterpenos⁷⁶.

Um grande número de atividades farmacológicas atribuídas aos polissacarídeos oriundos deste cogumelo é mediado pela atividade imunomoduladora dessas substâncias, como: atividade antitumoral⁷⁷, anti-inflamatória⁷⁸, antialérgica⁷⁹ e aumento de resistência a infecções.

Outras propriedades encontradas em substâncias produzidas por *G. lucidum* foram: atividade antioxidante, hipolipidêmica²⁸, hipocolesterolêmica, hipoglicêmica, antidiabética³², antiangiogênica e anti-HIV^{34,38}. Foram desenvolvidas técnicas para a produção de substâncias bioativas a partir do cultivo micelial dessa espécie em meios sólidos e líquidos, encurtando o tempo de produção e facilitando a padronização do produto final⁵.

Na Tabela 9.3 são apresentadas as substâncias ativas encontradas em *G. lucidum* e suas respectivas propriedades farmacológicas.

São comercializados cogumelos secos, pulverizados, encapsulados, extratos líquidos e em pó, ricos em polissacarídeos e produtos alimentícios suplementados com *G. lucidum*, como café e chocolate. Ainda não estão regulamentadas a produção e o uso deste cogumelo e produtos derivados no Brasil. Foi concluída no ano de 2015 a Consulta Pública nº14, de 15 de maio de 2012, sobre produtos da medicina tradicional chinesa, realizada pela ANVISA⁸⁰. O projeto originalmente não contempla os cogumelos mais especificamente, porém espera-se que o texto seja modificado para incluir essas importantes fontes de substâncias medicinais e nutracêuticas. Com a pressão de grupos internacionais que visam introduzir produtos no Brasil, de cultivadores brasileiros, de médicos que prescrevem e pacientes que consomem esses cogumelos, é de se esperar que tenhamos em breve posições mais claras acerca da legislação que normatiza e regula produtos desta espécie e de outras da medicina chinesa.

Tabela 9.3 Substâncias ativas encontradas em *Ganoderma lucidum* e seus respectivos efeitos

| SUBSTÂNCIA | EFEITOS | ANO | REFERÊNCIA |
|-------------------------------------|--|-------------|------------|
| Micélio | Imunomodulador, antitumoral | 2008 | 77 |
| | Antioxidante, hipolipidêmico, hipocolesterolêmico | 2011 | 28 |
| Triterpenos | Anti-inflamatório | 2009 | 78 |
| | Inibição da produção de óxido nítrico | 2013 | 81 |
| | Inibição da adipogênese | 2010 | 82 |
| | Antitumoral | 2010 | 83 |
| Polissacarídeos | Antialérgico | 2012 | 79 |
| | Anti-hiperglicêmico, anti-hiperlipidêmico | 2013 | 84 |
| | Anti-HIV | 2013 | 34 |
| Proteoglicana | Antioxidante, antidiabético, nefroprotetor | 2014 | 32 |
| Peptídeo glicano | Hipoglicêmico | 1986 | 85 |
| Extrato hidroalcoólico (etanol 70%) | Antiangiogênico, inibição da produção de óxido nítrico | 2004 | 86 |
| Polissacaropeptídeos | Apoptose, supressão da fosforilação de Erk1/2 estimulada por estresse oxidativo, resultando na inibição da expressão de c-fos e de fatores de transcrição AP-1 e NF-kappaB | 2008 e 2006 | 87, 88 |

9.3.2 *Cordyceps militaris*

Fungos ascomicetos do gênero *Cordyceps* também são conhecidos e utilizados pelos chineses há milênios (Figura 9.6). Trata-se, em sua maioria de cogumelos parasitos de insetos, relativamente raros e, assim, de preço elevado. *Ophiocordyceps sinensis* é uma espécie que ocorre naturalmente no platô tibetano da China e margeando os campos elevados do Nepal, Butão e Índia, usada tradicionalmente para uma série de aplicações medicinais⁹⁰. Acredita-se que a própria coleta excessiva pode estar tornando esta espécie cada vez mais rara.



Figura 9.6 Carpóforo de *Cordyceps militaris* emergindo de um inseto⁸⁹.

Atualmente se domina o cultivo micelial e de estromas de uma espécie próxima, denominada *Cordyceps militaris*, que produz princípios ativos semelhantes. Essa prática viabiliza a produção dessas substâncias em escala industrial^{91,92}.

Os compostos bioativos de *Cordyceps* geralmente são extraídos de corpo de frutificação (pó e extrato), micélio (extrato e pó) ou sobrenadante da fermentação.

Dentre tais biocompostos destacam-se: polissacarídeos extracelular e intracelular, cordicepina, adenosina, guanosina, cordimina, lovastatina, ácido Gama Aminobutírico (GABA), ergosta-4,6,8, 22-tetraen-3-ona(ergona);

5 α ,8 α -epidioxi-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol; 5 α ,8 α -epidioxi-22E-ergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol; 5 α ,6 α -epoxi-5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol; 5 α ,8 α -epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3 β -D-glucopiranosídio; 6-epoxi-24(R)-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol; miriocina; melanina; cordisinina A-E, sitosterol, ergosterol, e serina protease⁹³.

Para esses produtos, são citadas na literatura mais de 30 ações benéficas para o homem, quer como medicamentos quer como produtos nutracêuticos. As principais ações são: imunomoduladora, antifatiga, imunossupressora, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, antiglicêmica, antioxidante, anti-asma, produção de hormônio, antidepressão, anti-isquemia cerebral⁹³.

Polissacarídeos imunomoduladores e substâncias com alto poder antioxidante são produzidas por *C. militaris* em cultivo micelial^{30,94}. Esse cogumelo apresentou efeito hipolipidêmico e normalizou níveis de testosterona de camundongos expostos a dietas com alto conteúdo de lipídeos³³.

Extratos desse cogumelo também vêm demonstrando resultados promissores no tratamento da asma: inibem a proliferação e a diferenciação das células Th2 e reduzem a expressão de citocinas, por inibir a expressão do mRNA GATA-3 e estimular a expressão do mRNA Foxp3 em células mononucleares do sangue periférico. Esses extratos aliviam inflamações crônicas, por aumentar as concentrações de IL-10⁶⁸.

9.3.3 *Agaricus subrufescens* (*A. brasiliensis*, *A. blazei*)

Espécie nativa do Brasil, de taxonomia ainda controversa, conhecida popularmente como cogumelo-do-sol (Figura 9.7). Estudos sugerem que a espécie previamente identificada como *Agaricus blazei* e posteriormente denominada *A. brasiliensis* pode ser a mesma espécie que ocorre na América do Norte com o nome de *A. subrufescens*. Independentemente da classificação proposta, uma série de propriedades farmacológicas é atribuída a esta espécie pela medicina tradicional do interior do estado de São Paulo. Por este motivo, na década de 1960, pesquisadores japoneses levaram espécimes nativos do Brasil (mais especificamente da cidade de Piedade, no interior do estado de São Paulo), para serem cultivados e estudados quanto às suas propriedades medicinais. Atividades especialmente relacionadas à imunomodulação foram detectadas, inicialmente por pesquisadores japoneses e depois por vários grupos de pesquisa ao redor do mundo, como: atividade antitumoral, antialérgica, anti-inflamatória e aumento de resistência a infecções^{40,95,96}.

Em estudos clínicos com extratos deste cogumelo, foi detectado aumento de atividade de células NK e alívio de efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes com câncer de ovário, endométrio e na região cervical⁴⁸.

Polissacarídeos ligados a proteínas A-PBP apresentaram efeito hipolipidêmico e de controle de peso via mecanismo envolvendo absorção de colesterol⁶¹.

Extratos de *A. blazei* (*A. subrufescens*), em combinação com as substâncias metformina e gliclazida, resultaram em um aumento da resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2, devido ao aumento na concentração de adiponectina⁵⁹.

Descobriu-se também que polissacarídeos de *A. subrufescens* apresentam atividade antiviral, agindo no estágio inicial da replicação do vírus da poliomielite⁶⁷. Além disso, extratos deste cogumelo resultam no decréscimo nas concentrações de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, normalizando as funções do fígado de pacientes com hepatite B⁶⁴.



Figura 9.7 *Agaricus subrufescens*⁹⁷.

Apesar da utilização culinária ser possível, atualmente esta espécie é cultivada apenas para utilização medicinal. É comercializada na forma de corpos de frutificação secos em pedaços ou pulverizados, cápsulas de cogumelos secos pulverizados ou de extratos ricos em polissacarídeos. Contudo, apesar dos estudos científicos acerca das propriedades terapêuticas de substâncias

derivadas deste cogumelo, a legislação brasileira atualmente o aceita apenas como cogumelo comestível. Nenhuma propriedade farmacológica pode ser atribuída em material publicitário dos produtos formulados contendo substâncias oriundas deste cogumelo no país. Tudo indica que, com o volume de estudos realizados e o mercado que essas substâncias poderão alcançar, os procedimentos para regulamentação da utilização medicinal devam ser concluídos em breve. Este caso poderá ser um dos pioneiros na área de validação e regulamentação de fármacos derivados de cogumelos no Brasil.

9.4 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS DE COGUMELOS

Com base em informações da utilização tradicional e resultados experimentais rigorosos, novos produtos estão sendo desenvolvidos. Na Tabela 9.4 são apresentadas algumas patentes de produtos formulados com metabólitos bioativos obtidos a partir de cogumelos para a prevenção de doenças humanas, prova do grande interesse industrial e farmacêutico que os cogumelos vêm despertando.

Tabela 9.4 Patentes referentes a produtos contendo substâncias ativas de cogumelos

| ANO | PRODUTO | REFERÊNCIAS |
|------|--|-------------|
| 2013 | Proteína imunomoduladora de <i>Ganoderma microsporum</i> com atividade antitumoral | 98 |
| 2013 | Extratos antitumorais de <i>Cyathus striatus</i> | 99 |
| 2009 | Polissacarídeo de <i>Lentinus</i> spp. para aplicações em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos | 100 |
| 2009 | Polissacarídeos produzidos por cultivo micelial no estado sólido para aplicação em produtos nutracêuticos e farmacêuticos | 70 |
| 2003 | Cosméticos anidros contendo extratos de cogumelos | 101 |
| 2003 | Extratos do micélio de <i>Antrodia camphorata</i> , compostos principalmente por polissacarídeos, com atividade imunomoduladora, antitumoral e antiparasitária | 102 |
| 2003 | Extratos ricos em polissacarídeos, de diversas espécies de cogumelos, com atividades anticâncer, imunomoduladora, antioxidante, hipotensiva e hipoglicêmica, principalmente para a fabricação de medicamentos injetáveis | 103 |
| 2002 | Nutracêuticos contendo cogumelos ou extratos | 104 |
| 2002 | Proteínas de <i>Tricholoma conglobatum</i> e <i>Scutellariae barbatae</i> com atividade anticâncer | 105, 106 |

9.4.1 Antibióticos

Os fungos são notoriamente conhecidos como fontes de substâncias com atividade antibiótica, com destaque para o primeiro antibiótico (a penicilina), descoberta por Fleming em 1928. Fleming teve suas culturas bacterianas contaminadas por fungos do gênero *Penicillium*. Percebeu que estes fungos eram capazes de combater bactérias, e que deveriam produzir algum tipo de substância com ação antimicrobiana, o que foi comprovado em testes subsequentes. Uma série de técnicas foi desenvolvida para aumentar a produtividade e a escala do processo para a obtenção de penicilina, incluindo técnicas de mutação e manipulação genética¹⁰⁷.

Em 1950, foi encontrado um antibiótico de nome pleuromutilina em cogumelos do gênero *Clitopilus*¹⁰⁸. Plectasina, um peptídeo encontrado em uma espécie de cogumelo chamada *Pseudoplectania nigrella*, apresentou forte atividade antimicrobiana. Existem técnicas para produzir plectasina recombinante em grandes escalas^{109,110}.

Os cogumelos são fonte de antibióticos naturais, de baixa e alta massa molecular. Os compostos de baixa massa molecular são principalmente metabólitos secundários, tais como terpenos, esteroides, antraquinona e derivados do ácido benzoico. Já os metabólitos de alta massa molecular incluem, principalmente, os peptídeos e proteínas.

Nas últimas décadas, numerosos estudos *in vitro* têm demonstrado que essas substâncias apresentam atividades contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas¹¹¹⁻¹¹³ incluindo várias cepas de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos¹¹⁴. Tem sido sugerido que os efeitos antimicrobianos do extrato de cogumelo podem ser indiretos. Foi demonstrado que uma fração de polissacarídeo de *Agaricus brasiliensis* pode aumentar a resistência do hospedeiro contra alguns agentes infecciosos, pela estimulação da atividade microbicida dos macrófagos¹¹⁵.

Estudos modelos demonstraram efeitos antibacterianos de *A. blazei* contra *Streptococcus pneumoniae* em ratos com infecção sistêmica. A falta de um efeito antibiótico em pneumococos em estudo *in vitro* e o aumento dos níveis de citocinas MIP-2 e de TNF no soro de camundongos que receberam extrato do fungo levanta a hipótese de que seu efeito protetor pode estar relacionado ao sistema imunológico nato¹¹⁶. Em estudo posterior, os autores mostraram que um extrato de *A. blazei* pode proteger contra septicemia bacteriana letal em um modelo de peritonite em rato¹¹⁷.

Extratos de *A. bisporus* têm maior número de estudos antimicrobianos realizados. Seu extrato metanólico revelou atividade contra *Bacillus subtilis*,

em concentração menor do que a ampicilina (MIC = 12,5 mcg/mL)⁷. O metabólito também foi eficiente contra *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *M. flavus*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*¹¹⁸⁻¹²⁰.

9.4.2 Doenças cardiovasculares

Os cogumelos são uma fonte nutricional bastante saudável, contendo baixos níveis de lipídeos e açúcares e altas concentrações de fibras, vitaminas e proteínas. Não apenas são alimentos de baixa caloria, mas também apresentam substâncias que podem colaborar na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares.

Estatinas presentes nos cogumelos do gênero *Pleurotus* reduzem os níveis de colesterol LDL no sangue. Substâncias presentes no micélio das espécies *G. lucidum* e *A. subrufescens* reduzem as concentrações de triglicérides e de colesterol total no sangue²⁸. Foi demonstrado que lectinas, presentes em cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus*, apresentam efeito supressor do apetite¹²¹.

Várias espécies de cogumelos comestíveis, incluindo shiitake, cogumelos-ostra e maitake, apresentam altas concentrações de ergotioneína, aminoácido com alto poder antioxidante e que pode atuar na prevenção de doenças coronarianas³.

Triterpenos produzidos por *G. lucidum* inibem a adipogênese por um mecanismo que envolve a redução da expressão de um gene relacionado ao processo, chamado SREBP-1c⁸². Outras atividades farmacológicas encontradas em cogumelos e que podem contribuir para a prevenção de doenças cardiovasculares são: redução da agregação de plaquetas e diminuição da pressão arterial¹²².

9.4.3 Antiparasitários

Extratos de cogumelos têm sido avaliados na busca de medicamentos contra protozoários, pois os medicamentos disponíveis apresentam graves efeitos colaterais. Extratos obtidos a partir do produto de cultivo micelial em meio líquido de três diferentes espécies de macromicetos comestíveis nativos, isolados pelo grupo (*Pleurotus djamor*, *Lycoperdon marginatum* e *Oudemansiella canarii*) foram avaliadas quanto à sua atividade frente à *Leishmania infantum*, causadora da leishmaniose visceral^{123,124}. Foi utilizada

uma metodologia baseada na incorporação de timidina radiomarcada, em microcultivos dos parasitas. Foram obtidos os seguintes valores de CPM para cada tratamento testado: controle positivo (695 ± 20), controle negativo (1628 ± 113), *P. djamor* (1082 ± 272), *L. marginatum* (775 ± 139) e *O. canarii* (806 ± 138). Duas espécies medicinais nativas (*Ganoderma applanatum* e *G. stipitatum*) também foram testadas contra *L. infantum*, utilizando uma metodologia envolvendo a incubação dos parasitas em microcultivos contendo o reagente MTT¹²⁵. Os resultados obtidos (absorbância em 540 nm) foram: controle positivo ($0,290 \pm 0,059$), controle negativo ($0,043 \pm 0,102$), *G. applanatum* ($0,059 \pm 0,013$) e *G. stipitatum* ($0,294 \pm 0,042$).

Também os fungos têm sido relatados como inimigos naturais de nematoides parasitos de humanos, animais e plantas. São capazes de desenvolver estratégias para infectar ou capturar nematódeos, para sua alimentação ou sobrevivência. Mais de 200 espécies de fungos nematófagos estão catalogadas. São classificados em três grupos com base no mecanismo de ação: predadores, endoparasitos e parasitos de ovos¹²⁶.

As espécies de fungos pertencentes ao grupo dos predadores formam armadilhas como redes adesivas, anéis constritores ou não, botões ao longo de suas hifas, utilizando-as para capturar e penetrar no corpo do nematoide e consumi-lo rapidamente¹²⁷. Os fungos endoparasitos infectam os nematoides através de seus esporos. A infecção pode ocorrer através da aderência do esporo à cutícula do nematoide ou através da sua ingestão. Os esporos germinam rapidamente e se difundem pela cavidade corpórea, absorvendo todo o conteúdo do nematoide¹²⁸. Os fungos parasitos de ovos fixam suas hifas de modo a danificar a casca do ovo, provavelmente pela ação de enzimas, facilitando a penetração para, em seguida, provocar sua destruição¹²⁹.

Um quarto grupo foi proposto por Li et al. (2000)¹³⁰, que são os fungos produtores de toxinas, como *Pleurotus ostreatus*, que imobiliza o nematoide pela toxina produzida por suas hifas especializadas, as quais crescem quimiotropicamente em direção a boca de suas presas, digerindo-as¹²⁶. Luo et al. (2006) relataram que o fungo *Stropharia rugosoannulata* poderia representar um quinto grupo, pois age mecanicamente, danificando a cutícula do nematoide com uma estrutura redonda e espinhosa denominada “*spiny ball*”¹³¹.

Estudos envolvendo fungos nematófagos na saúde animal tiveram seu início no século XX, na França^{132,133}. Na década de 1990, vários estudos com fungos nematófagos foram realizados, impulsionados pela busca de alternativas no controle da verminose, tendo em vista o crescente aumento

da resistência anti-helmíntica, principalmente em pequenos ruminantes, relatado por diversos pesquisadores do Brasil¹³⁴⁻¹³⁸ e de outras regiões do mundo¹³⁹⁻¹⁴¹.

Estudo realizado na Holanda por Eysker et al. (2006)¹⁴² e outro na Suíça por Faessler et al. (2007)¹⁴³ administraram por via oral em cordeiros a dose diária de 5×10^5 e 10^6 clamidiosporos de *D. flagrans* por quilograma, respectivamente, por um período de quatro meses. Não encontraram nenhum efeito significativo em parâmetros parasitológicos como contagem de ovos por grama de fezes, contagem de larvas de terceiro estágio (L3) na pastagem e ganho de peso, embora a atividade do fungo tenha sido claramente visível nas coproculturas.

Os principais gargalos para o desenvolvimento de formulações comerciais de fármacos e nutracêuticos antiparasitários usando cogumelos são a produção em larga escala, armazenamento e a forma de administração¹⁴⁴.

9.4.4 Imunomoduladores

Sabe-se que os cogumelos produzem substâncias capazes de modular o sistema imunológico^{29,96}. Não apenas são capazes de estimulá-lo, mantendo as defesas altas, mas também podem amenizar as reações imunológicas exacerbadas das alergias.

O aumento da resistência a infecções, conferido pelo consumo de cogumelos, está associado à ativação do sistema imunológico. Também a atividade antitumoral dos cogumelos está em grande parte associada a essa ativação⁷⁷.

As células “*natural killer*” (NK) são células diretamente relacionadas ao combate a células estranhas, como células tumorais ou micro-organismos patogênicos. Os cogumelos contêm substâncias capazes de estimular as células NK, bem como outras populações de células de defesa, como alguns tipos de linfócitos T e B¹⁴⁵.

Polissacarídeos ricos em cadeias de β -glucanas foram identificados como responsáveis por alterações na contagem de diferentes tipos de células do sistema imunológico e na produção de moléculas sinalizadoras, como citocinas e óxido nítrico^{40,146}. Polissacarídeos de *Antrodia camphorata*, por exemplo, estimulam a produção da citocina IL-2 por células Th1, enquanto inibem a produção de IL-4 por células Th2¹⁰². Outras classes de compostos imunomoduladores são: lectinas, terpenoides e proteínas²⁹. Triterpenos e o extrato etanólico de *G. lucidum* inibem a produção de óxido nítrico por macrófagos^{81,86}.

9.4.5 Antitumorais

Diversos são os mecanismos de ação antitumoral de substâncias derivadas de cogumelos. Algumas dessas moléculas são capazes de combater células tumorais, de maneira indireta, através da ativação do sistema imunológico⁷⁷. Dentre essas substâncias indiretamente antitumorais se destacam polissacarídeos, frequentemente glucanas⁷². Glucanas nada mais são que cadeias de moléculas de glicose. Contudo, dadas as diferentes possibilidades de ligação entre as subunidades, existem diferentes tipos de glucanas. Foram identificadas em cogumelos glucanas especialmente ativas, cuja estrutura principal consiste em cadeias de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3), com ramificações do tipo β -(1 \rightarrow 6) (Figura 9.8). Essas glucanas ativam linfócitos T, linfócitos B, células NK, neutrófilos, pela interação com receptores celulares específicos. A massa, o padrão de ramificações, a conformação espacial e modificações químicas podem influenciar a atividade dessas moléculas. Também já foram encontrados em cogumelos alguns polissacarídeos ativos formados por diferentes unidades monossacarídicas (heteropolissacarídeos) e complexados com unidades proteicas (proteoglucanas)³⁴. Existe uma série de produtos comerciais cujos compostos ativos são esses polissacarídeos. Lentinana é o nome de um polissacarídeo extraído da espécie *Lentinula edodes* (o shiitake)¹⁰⁰. A esquizofilana é extraída de *Schizophyllum commune*. O PSK, também denominado Krestin comercialmente, é extraído de *Trametes versicolor*. Grifolana é extraída do cogumelo comestível *Grifola frondosa*¹⁴⁷. Diversas outras espécies produzem polissacarídeos imunomoduladores, como *G.lucidum*⁷⁷, *C.militaris*⁹⁴ e *A.subrufescens*⁹⁶.

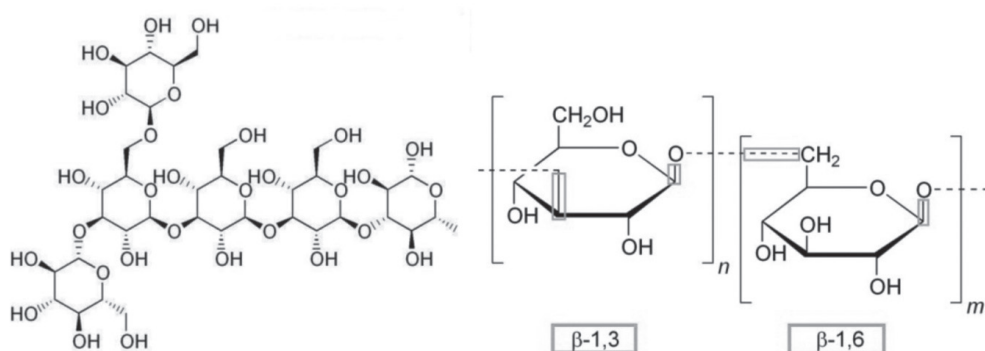


Figura 9.8 Cadeia de glucana β (1 \rightarrow 3) com ramificações β (1 \rightarrow 6) (esquerda). Diagrama destacando posições das ligações (direita).

Outras substâncias derivadas de cogumelos apresentam atividade antitumoral por outros mecanismos, como substâncias de baixa massa molecular encontradas na espécie *Cyathus striatus*, que inibem a multiplicação das células tumorais pela redução da síntese de DNA e indução da apoptose⁹⁹. Proteínas derivadas de *Tricholoma conglobatum* e *Scutellariae barbatae* apresentam atividade antitumoral por inibir o crescimento de células endoteliais e a vascularização de tecidos^{105,106}.

Os mecanismos de atividade antitumoral de triterpenos de *G. lucidum* sobre células HeLa foram estudados seguindo uma abordagem proteômica. Foram observados efeitos de modulação sobre a expressão de proteínas envolvidas na proliferação e morte celular, carcinogênese, estresse oxidativo e sinalização de cálcio⁸³.

9.4.6 Antioxidantes

O cultivo micelial submerso de macromicetos está sendo estudado como via para a produção de substâncias antioxidantes a partir de resíduos agroindustriais, atualmente descartados em grande quantidade em nosso país²⁸.

O resíduo líquido obtido pela prensagem do bagaço de pupunha e a água residual de hidratação desse substrato depois de seco e reidratado foram testados, com sucesso, como meio de cultivo para diferentes cepas de macromicetos do gênero *Pleurotus*. Foram testadas águas residuais de hidratação de duas diferentes frações da planta (interna e externa) e cepas de duas diferentes espécies (*P. ostreatus* e *P. djamor*). Os maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos com *P. djamor* cultivado na fração interna, apresentando atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) de $0,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ¹⁴⁸.

Um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman de 12 fatores foi aplicado para avaliar o efeito de cinco diferentes fatores (razão volume/superfície e adição de sulfato de cobre, sulfonato de lignina, peróxido de hidrogênio e anilina aos meios de cultivo) como indutores de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no produto do cultivo micelial submerso de uma cepa de *Pleurotus ostreatus*. A adição de sulfonato de lignina aos meios de cultivo praticamente triplicou os níveis de atividade enzimática dos produtos¹⁴⁹.

Da mesma forma, um planejamento experimental multivariado foi utilizado para avaliar a influência de seis variáveis: concentração de substrato, tempo de cultivo, adição de extrato de levedura, glicose, sulfato de cobre e

sulfato de zinco, sobre a atividade antioxidante do produto do cultivo de *P. djamor*, utilizando como substrato o resíduo líquido obtido pela prensagem do bagaço de pupunha¹⁵⁰. Os fatores mais significativos para o aumento da atividade antioxidante testados foram: a concentração de substrato e a adição de extrato de levedura.

9.4.7 Antidiabéticos

O diabetes *mellitus* é a doença endócrina mais comumente encontrada na população, com variadas causas na sua etiologia e patogenesia. Atividades antidiabéticas do extrato etanólico da matéria seca do caldo de *Coriolus versicolor*, obtido por fermentação submersa, foi estudado³¹. Nesse estudo, os autores observaram melhora nos quadros de hiperglicemia, hiperlipidemia, estresse oxidativo e atividade protetora contra as células pancreáticas β em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina.

9.5 PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS A PARTIR DO CULTIVO MICIAL SUBMERSO DE *GANODERMA LUCIDUM*

O ciclo de produção da espécie *G. lucidum* pode levar de quatro a seis meses para desenvolvimento completo dos corpos de frutificação. Porém, algumas substâncias podem ser produzidas a partir do cultivo micelial em meios sólidos ou líquidos, em menos de um mês, se a incubação for realizada nas condições ótimas de temperatura e aeração^{28,70,151}. Biorreatores usuais para o cultivo em meios líquidos incluem frascos Erlenmeyer, agitados ou não, garrafões, biorreatores de bancada (Figura 9.9) ou fermentadores em escala industrial.

Vários tipos de sensores podem ser adaptados para o monitoramento e o controle dos processos, como sondas de CO₂ e O₂, turbidímetros, e refratômetros. Os parâmetros passíveis de controle incluem a temperatura, a taxa de aeração, a velocidade de agitação, o pH, a remoção de produtos e realimentação de nutrientes.

O protocolo aqui sugerido foi adaptado de técnicas correntemente utilizadas na pesquisa e na produção industrial^{34,76,151}, para realização em pequena escala. O processo consiste na obtenção de linhagens, formulação de meios líquidos, distribuição em recipientes de cultivo, autoclavagem, inoculação

com culturas miceliais puras, incubação e operações de recuperação e purificação de exopolissacarídeos (Figura 9.10).

Cada uma das etapas será mais detalhadamente descrita a seguir.



Figura 9.9 Biorreator de bancada.

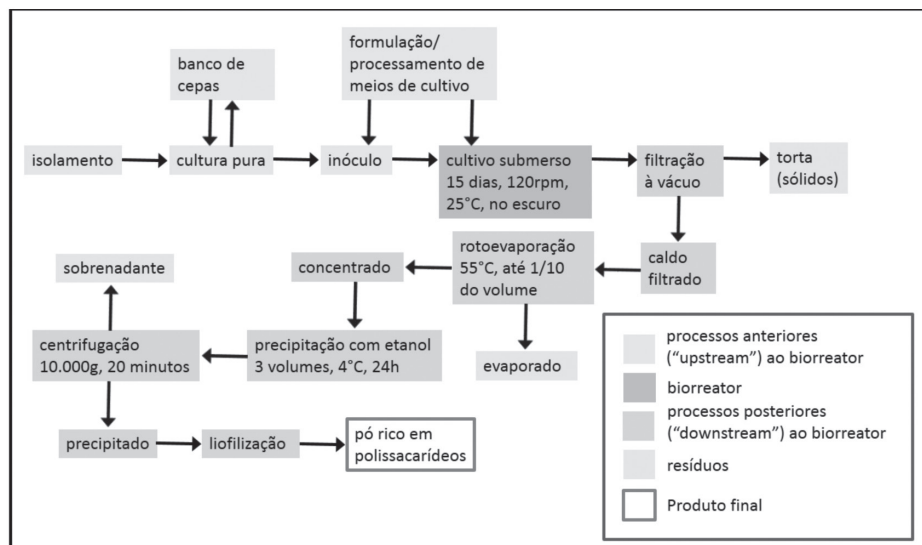


Figura 9.10 Fluxograma da produção de exopolissacarídeos a partir do cultivo micelial submerso.

9.5.1 Obtenção de cultura pura

O processo de isolamento de novas estirpes depende de maneira fundamental da obtenção e da seleção de linhagens com boa produtividade de exopolissacarídeos ativos, nos meios e nas condições de cultivo mais adequados à localidade em que será implantada a produção. Existem culturas de linhagens puras de diversas espécies de cogumelos disponíveis em bancos de cepas nacionais e internacionais, como a ATCC¹⁵², além de existirem empresas especializadas na produção e no comércio de matrizes e sementes.

Um novo isolado também pode ser obtido utilizando esporos ou tecidos de corpos de frutificação como ponto de partida. Quando esporos são utilizados, ocorrem processos de recombinação genética, gerando novas linhagens. No caso de realizar isolamento a partir de tecidos de corpos de frutificação, são obtidos clones do cogumelo original. Em ambos os casos, o material deve ser transferido, da maneira mais asséptica possível, para meios de cultivo adequados.

Exemplos de meios de cultivo usualmente empregados para cogumelos saprofíticos incluem ágar batata dextrosado (BDA) e ágar extrato de malte (MEA). Para cogumelos micorrízicos existem meios mais enriquecidos, como o Melin Norkrans modificado (MMN). *Ganoderma lucidum* é um cogumelo necrosaprofítico no sentido de que parasita árvores até a sua morte e, após, continua a decompor seus tecidos. Este cogumelo é facilmente cultivado nos meios BDA e MEA.

Para se coletar esporos, podem ser empregadas campânulas de vidro e superfícies de papel-alumínio autoclavadas. O píleo é posicionado com o himênio para baixo.

Quando possível, deve-se cortar o estipe, de forma que faça uma base para apoiar o cogumelo, evitando tocar as lamelas no papel-alumínio. Também pode ser utilizado arame para confeccionar um suporte, para posicionar o cogumelo. O conjunto todo pode ser coberto com uma campânula, para evitar que correntes de ar dispersem os esporos ou que tragam contaminações. Se o cogumelo já estiver relativamente seco, um pedaço de papel encharcado com água esterilizada pode ser colocado no interior da campânula, para manter a umidade alta. Se estiver no ponto de desenvolvimento correto, o cogumelo liberará esporos, fazendo uma impressão sobre o papel-alumínio (Figura 9.11).

O sistema pode ser então desmontado e o cogumelo descartado como lixo orgânico comum. A campânula e o suporte podem ser lavados e utilizados novamente. O papel-alumínio, contendo esporos, pode ser armazenado

conforme descrito na Seção 9.5.2. Para reativá-los basta transferi-los para placas de Petri (esterilizadas) contendo meios de cultivo adequados e incubá-los no escuro. Para *G. lucidum* o meio de cultivo pode ser BDA ou MEA e a temperatura de incubação, 25 °C.

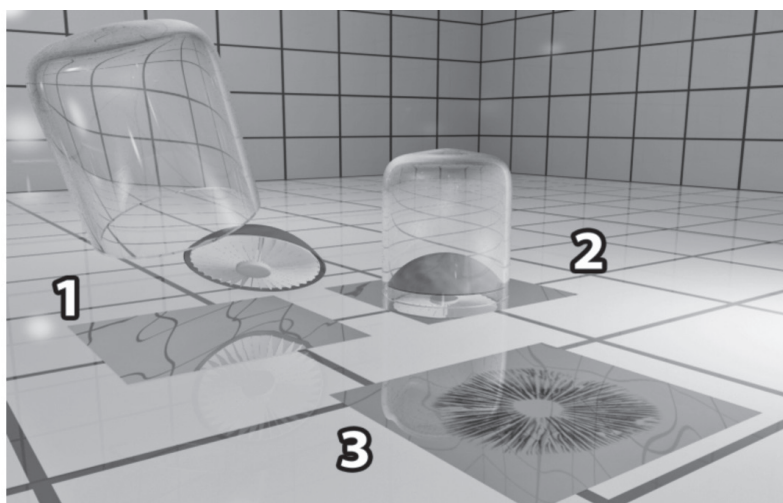


Figura 9.11 Representação esquemática de técnica para coleta de esporos: (1) Campânula de vidro e papel-alumínio autoclavados; pílão com himênio voltado para baixo, estipe cortado. (2) Sistema montado para coleta de esporos. (3) Impressão de esporos.

A esporada de *G. lucidum* apresenta coloração de ferrugem, entre laranja e marrom. Quando maduros, os corpos de frutificação de *G. lucidum* produzem esporos por vários dias ou até meses. Porém, quando colhidos, a produção de esporos cessa, de maneira que é interessante para esta espécie adaptar a técnica para coletar os esporos com o cogumelo ainda crescendo no substrato. Para tanto, basta posicionar folhas de papel-alumínio sob o himênio, no próprio local de frutificação. Dessa forma, maior quantidade de contaminantes irá se misturar aos esporos, contudo, devido à abundante esporulação desta espécie, uma espessa camada será depositada. Posteriormente, técnicas de isolamento poderão ser utilizadas para eliminar as contaminações.

Pelo menos duas técnicas podem ser utilizadas para distribuir os esporos:

- 1) Lavar a superfície do alumínio com água esterilizada e distribuir gotas da suspensão obtida sobre o meio de cultivo fresco, previamente esterilizado

e distribuído em placas de Petri, com o auxílio de uma pipeta, também esterilizada.

- 2) Utilizar uma alça de platina previamente flambada e resfriar em meio semissólido de cultivo. Antes do completo resfriamento (<42 °C, aproximadamente), passar a alça, com um pouco de gel aderido, sobre a superfície repleta de esporos do papel-alumínio; um grande número de esporos fica aderido ao gel. Os esporos são depositados sobre meio de cultivo fresco, podendo-se utilizar a técnica de estriamento para espalhar os esporos e distanciar os focos de contaminação de áreas com micélio saudável.

Para isolamento, a partir de tecidos dos corpos de frutificação, devem-se selecionar os indivíduos mais saudáveis e com características mais desejáveis (no caso deste exemplo, alta produção de exopolissacarídeos), visto que o isolamento gerará clones deste cogumelo inicial.

Uma assepsia superficial deve ser realizada a seco, removendo partes contaminadas e sujidades. Se necessário, cortar e eliminar porções do cogumelo. Com o cogumelo superficialmente limpo, se faz uma incisão superficial com o auxílio de um bisturi flambado, e o corpo de frutificação é então cortado ao meio com as mãos. Isto é feito para evitar carregar contaminações da superfície para o interior do cogumelo. Ainda, com o auxílio do bisturi flambado, corta-se um pedaço pequeno descontaminado de uma região interna do píleo ou do estipe, e transfere-se para meio de cultivo fresco adequado. A extremidade mais jovem do píleo é a região mais fácil de cortar e com mais probabilidade de sucesso no isolamento de *G. lucidum*.

Independentemente da técnica de isolamento, podem ser necessários repiques sucessivos para eliminar completamente qualquer foco de contaminação e para selecionar os isolados mais vigorosos.

9.5.2 Manutenção da cultura pura

Esporos coletados sobre papel-alumínio podem ser armazenados em tubos de ensaio ou placas de Petri previamente autoclavados. Mesmo à temperatura ambiente, esporos podem ser mantidos viáveis na ausência de luz e baixa umidade, por vários anos.

Culturas miceliais puras em placas de Petri ou tubos de ensaio com meio semissólido inclinado normalmente podem ser mantidas por semanas até meses à temperatura ambiente e por meses na geladeira (4 °C). Micélio de *G.*

lucidum pode sobreviver nessas condições por mais de seis meses, mas usualmente não é possível conservar cepas nessas condições por anos. Consequentemente, para manter culturas puras dessa forma, se fazem necessários repiques periódicos. Algumas cepas não suportam refrigeração e precisam ser mantidas em temperatura ambiente. A manutenção prolongada de micélios por repique pode levar à seleção de mutações indesejadas e a consequente degeneração das linhagens.

Para períodos de conservação mais longos existem outras técnicas, como a submersão em água estéril ou óleo mineral e técnicas de criopreservação em *ultrafreezer* ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). São necessárias substâncias crioprotetoras (como, por exemplo, glicerol) e/ ou suportes adequados (como, por exemplo, perlita ou vermiculita) à criopreservação. Com essas técnicas de conservação a baixas temperaturas, podem-se conservar culturas miceliais de diversas espécies viáveis por muitos anos, e imagina-se que até mesmo por séculos, mantendo características genéticas estáveis.

9.5.3 Cultivo micelial submerso

Para a elaboração de um inóculo líquido, utilizar frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultivo, fechados com tampões de algodão e recoberto com papel pardo preso com elástico. Os recipientes devem ser apenas parcialmente cheios. O espaço deixado deve permitir a agitação e a formação de espumas, durante a incubação, sem transbordamento. O tempo de autoclavagem deve ser adequado ao tamanho dos recipientes de cultivo. Recipientes maiores levam tempo maior para atingirem a temperatura de autoclavagem até o centro do seu volume. É importante lembrar que tempo insuficiente na autoclavagem pode resultar na sobrevivência de contaminantes, mas, por outro lado, a autoclavagem por tempo excessivo pode resultar em reações indesejáveis, como a caramelização de açúcares e a formação de compostos tóxicos a partir da reação entre compostos orgânicos, como açúcares e proteínas.

O protocolo adequado a cada situação deve ser validado mediante experimentação criteriosa. Para os frascos de 500 mL, de 15 a 20 min. a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ é um tempo suficiente de tratamento térmico.

Após o resfriamento dos recipientes contendo os meios de cultivo à temperatura ambiente, realiza-se a inoculação com culturas miceliais puras, previamente desenvolvidas sobre meio semissólido distribuído em placas de Petri. A transferência de pedaços de meio semissólido coberto de massa

micelial é feita, preferencialmente, em câmara de fluxo, com o auxílio de uma alça microbiológica e bico de Bunsen para flambá-la, ou utilizando materiais adequadamente embalados e esterilizados. De três a seis pedaços de aproximadamente 0,5 cm² de BDA cobertos de micélio são suficientes para uma boa inoculação de 250 mL de meio líquido. Após a transferência, os frascos devem ser novamente fechados com tampão de algodão e com o papel. Os frascos são incubados em agitador orbital, a 25 °C, 120 rpm, por duas semanas. Deve ser observado crescimento micelial, pela formação e multiplicação de “*pellets*” em suspensão. O líquido não deve turvar durante o cultivo, pelo contrário, o meio pode até mesmo ter sua turbidez reduzida durante o processo. Turvação do meio em cultivo micelial submerso de macromicetos usualmente significa contaminação.

O pré-inóculo, preparado conforme descrito, pode ser utilizado para inocular volumes até dez vezes maiores de meio de cultivo. Para o presente protocolo, sugerimos a inoculação de cinco frascos Erlenmeyer de 1.000 mL, contendo 450 mL de meio de cultivo fresco e autoclavado, com 50 mL do inóculo, cada. Os frascos inoculados devem ser incubados em agitador orbital, a 25 °C, 120 rpm, por duas semanas, para concluir o crescimento micelial e a produção de exopolissacarídeos.

9.5.4 Recuperação dos exopolissacarídeos

Após um crescimento abundante de micélio, livre de contaminações, o meio líquido estará repleto de exopolissacarídeos. A biomassa pode ser separada do caldo por filtração. Esse caldo rico em exopolissacarídeos pode, teoricamente, ser consumido diretamente. Porém, devido à baixa concentração dos princípios ativos e às características organolépticas indesejáveis, processos de recuperação e purificação se fazem necessários. A simples secagem do produto, utilizando equipamentos como *spray-dryer* ou liofilizador, reduz bastante o volume, aumentando drasticamente a concentração de princípios ativos. Para maior grau de purificação, pode ser empregada uma precipitação de polissacarídeos com etanol previamente à secagem. Esse procedimento apresenta duas vantagens: são eliminadas impurezas solúveis em uma mistura de água e álcool e se gasta menos energia e tempo com processos de secagem. A desvantagem é a utilização de grandes quantidades de solvente. Para reduzir a quantidade de solvente utilizada recomenda-se o seguinte protocolo:

- 1) Reduzir o volume do caldo por rotoevaporação, até 1/10 do volume original.
- 2) Adicionar 3 volumes de etanol gelado e deixar a 4 °C precipitando, por 24 horas.
- 3) Recuperar o precipitado por centrifugação a 10.000 xg por 20 min., a 4 °C.
- 4) Secar o precipitado por liofilização.

Etapas adicionais podem ser aplicadas antes da precipitação com etanol para aumentar o grau de purificação, tais como: eliminação de proteínas pelo método Sevag e eliminação de sais e compostos com baixa massa molecular por diálise. Após a precipitação, técnicas cromatográficas podem ser utilizadas para a obtenção de polissacarídeos altamente purificados. As colunas mais utilizadas para essa finalidade são de troca iônica e de gel-filtração³⁴.

Novas técnicas de extração, mais práticas, eficientes, econômicas, seguras e sustentáveis continuam sendo desenvolvidas, como, por exemplo, a utilização de fluidos supercríticos. O processo de extração de polissacarídeos e ácidos ganodéricos de *G. lucidum* utilizando fluidos supercríticos foi patenteado recentemente⁷⁶.

9.5.5 Técnica analítica para avaliar o rendimento da produção de exopolissacarídeos e estimar o grau de pureza do produto final

A massa do extrato rico em polissacarídeos obtido conforme descrito na Seção 9.5.4 dividida pelo volume de meio de cultivo empregado para a extração representa uma medida de rendimento da produção desse tipo de material.

Contudo, outros tipos de biomoléculas podem estar sendo recuperados em conjunto com os polissacarídeos. Para avaliar o grau de pureza dos polissacarídeos, diversos testes podem ser feitos. Dois testes colorimétricos simples estão descritos a seguir e podem ser utilizados tanto para avaliar a proporção de polissacarídeos no material purificado, depois da liofilização do precipitado, como também podem ser empregados para estimar a concentração de EPS diretamente no caldo de cultivo, permitindo otimizar o processo de produção, evitando a realização de etapas de extração e purificação para os testes.

Além disso, essa técnica permite acompanhar a produção de EPS ao longo do tempo em um processo de cultivo. Basta retirar alíquotas do caldo, de maneira asséptica, em intervalos definidos, para realizar as análises sem interromper o cultivo. Esse tipo de estudo se denomina cinética, neste caso específico, cinética da produção de EPS.

Para estimar a concentração de polissacarídeos produzidos, pode-se combinar resultados de um método de dosagem de açúcares redutores (DNS) com um método de dosagem de açúcares totais (fenol-sulfúrico). Uma relação simples pode ser utilizada:

$$\text{(Equação 9.1)} \quad A_t = A_r + \text{EPS}$$

em que A_t = açúcares totais, A_r = açúcares redutores e EPS = exopolissacarídeos.

Rearranjando:

$$\text{(Equação 9.2)} \quad \text{EPS} = A_t - A_r$$

Essa relação permite estimar a concentração de EPS no caldo de cultivo, a partir da determinação analítica da concentração de açúcares totais e açúcares redutores.

O método de dosagem de açúcares redutores (o A_r da Equação 9.2) utilizando o reagente DNS pode ser realizado conforme descrito por Miller (1959)¹⁵³.

Material

- Reagente ácido dinitrossalicílico (DNS): dissolver sob agitação 1 g de DNS, 200 mg de fenol cristalino e 50 mg de sulfito de sódio em 100 mL de NaOH 1%. Armazenar a 4 °C. Para estocagem, adicionar o sulfito apenas logo antes de usar.
- Solução 40% de sal de Rochelle (tartarato de sódio e potássio).

Método

- 1) Em tubos de ensaio, adicionar iguais volumes da amostra e do reagente DNS. Exemplo: 3 mL de amostra + 3 mL de reagente DNS. Obs.: Pode ser necessário diluir a amostra com água destilada se a concentração de açúcares for muito alta para a faixa de sensibilidade do método.

- 2) Ferver em banho-maria por 5 minutos.
- 3) Com o material quente, adicionar 1 mL da solução de sal de Rochelle 40%.
- 4) Deixar esfriar e ler a absorbância em 510 nm, em um espectrofotômetro.
- 5) Interpretar os resultados utilizando uma curva padrão, elaborada fazendo-se experimentos com soluções de glicose a várias concentrações (pelo menos 5) de 0 até 150 µg/mL.

O método de dosagem de açúcares totais, utilizando os reagentes fenol e ácido sulfúrico, pode ser realizado conforme descrito por Du Bois et al. (1956)¹⁵⁴

Material

- Solução de fenol 80% (m/v), ácido sulfúrico concentrado

Método

- 1) Em tubos de ensaio, adicionar 100µL de amostra, adequadamente diluída.
- 2) Adicionar 50 µL da solução de 80% de fenol.
- 3) Homogeneizar com um vórtex.
- 4) Adicionar 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, em câmara de exaustão.
- 5) Aguardar 10 min.
- 6) Ler a absorbância a 490 nm em um espectrofotômetro.
- 7) Analisar os resultados com base em uma curva padrão, elaborada com soluções de glicose a várias concentrações (pelo menos 5) entre 0 µg/mL e 800 µg/mL.

Este método apresenta o inconveniente da manipulação de substâncias perigosas como o fenol e o ácido sulfúrico, além de não permitir uma análise detalhada da composição e das estruturas dos polissacarídeos. Porém, é relativamente de fácil execução e pode ser útil para realizar experimentos que necessitem da simples quantificação de polissacarídeos em caldos de cultivo.

Existem técnicas desenvolvidas para a determinação da composição monossacarídica, massa molecular e estrutura tridimensional dos polissacarídeos. Todavia, fogem às limitações do escopo deste capítulo.

9.6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Diversas substâncias derivadas de muitas espécies de cogumelos vêm demonstrando atividades medicinais importantes em estudos científicos. Porém, por enquanto, nenhum cogumelo ou substância derivada é reconhecido ou normatizado no Brasil pela ANVISA como medicinal. Sugere-se uma colaboração mais intensa entre universidades, poder público e setor privado para que o conhecimento produzido nas universidades seja efetivamente transferido ao setor produtivo, beneficiando a população.

O melhor conhecimento das espécies de cogumelos da biodiversidade brasileira e suas propriedades medicinais permitirão o desenvolvimento de novos medicamentos ou nutracêuticos para a prevenção e tratamento de enfermidades que afligem a população, como câncer, infecções e doenças cardiovasculares.

Mais estudos também devem ser conduzidos para avaliar potenciais atividades medicinais da inclusão de cogumelos na alimentação, estimulando o consumo e a produção, contribuindo para o esclarecimento popular e alterando uma cultura de medo e aversão em relação aos cogumelos. Diversas instituições de pesquisa, espalhadas pelo país, estão dando passos nessa direção, listando e descrevendo as espécies de cada região, buscando tecnologias para a propagação de micélios e cultivo de cogumelos, testando aplicações tecnológicas de materiais e substâncias derivadas desses organismos na prevenção e tratamento de um grande número de enfermidades. Com as tecnologias existentes nos laboratórios de pesquisa brasileiros hoje é possível identificar e isolar os princípios ativos, descrever sua estrutura molecular e aplicar técnicas de DNA recombinante para aumentar a sua produtividade e atividade.

Espera-se que novos produtos biotecnológicos sejam desenvolvidos em decorrência dos avanços tecnológicos recentes nas áreas de produção e purificação de substâncias medicinais a partir de cogumelos ou cultivos miceliais, refletindo em benefícios econômicos e ecológicos e contribuindo para uma vida mais saudável.

REFERÊNCIAS

1. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 2007;111(5):509-47.
2. Soccol CR, Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FM, Leifa F, Pandey A, et al. Mushrooms: a promising source to produce nutraceutical and pharmaceutical bioproducts. In: Koutinas A, Pandey A, Larroche C, editors. *Current topics on bioprocessing in food industry*. 2. 1 ed: New Delhi: Asitech Publishers; 2007. p. 435-48.
3. Dubost NJ, Ou B, Beelman RB. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2007;105(2):727-35.
4. Arango CS, Nieto IJ. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestíveis: una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013;30(1):1-8.
5. Arango CS, Nieto IJ. Biotechnological cultivation of edible macrofungi: an alternative for obtaining nutraceutics. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013;30(1):1-8.
6. Bernal J, Mendiola JA, Ibáñez E, Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;55(4):758-74.
7. Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(8):2742-7.
8. Putzke J, Putzke MTL. *Os Reinos dos Fungos*. 1 ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC; 2002.
9. Meijer AARD. *Macrofungos notáveis das florestas de pinheiro-do-paraná*. Colombo: Embrapa; 2008.
10. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. *Microbiologia – conceitos e aplicações*. 2 ed. São Paulo: Makron Books; 1996.
11. Masur. *Saccharomyces cerevisiae* under DIC microscopy 2010 [Internet]. [Cited 2016 Nov 4]. Available from: pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg.
12. Y_Tambe. Microscopic image of *Penicillium* sp. (environmental isolate). Magnification:200 2005 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillium.jpg.
13. Robinson RF, Davidson RS. The Large-Scale Growth of Higher Fungi. *Advances in Applied Microbiology*. 1959;1:261-78.
14. Ross RC, Harris PJ. The significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation. *Scientia Horticulturae*. 21(1):61-70.
15. Chang ST. Mushrooms from waste. *Food Policy*. 1980;5(1):64-5.

16. Bononi VL, Capelari M, Maziero R, Trufem SFB. Cultivo de Cogumelos Comestíveis. São Paulo: Ícone; 1999.
17. Yokomizo NKS, Bononi VLR, editors. Cogumelos comestíveis: perspectivas de introdução de outras espécies no mercado brasileiro. I Encontro Nacional Sobre Cogumelos Comestíveis. Mogi da Cruzes: Secretaria de Agricultura e Abastecimento; 1980.
18. Vázquez JES. Producción de hongos comestibles. San Cristóbal de las Casas: Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste; 1994. 107 p.
19. Simon RR, Phillips KM, Horst RL, Munro IC. Vitamin D Mushrooms: comparison of the composition of button mushrooms (*agaricus bisporus*) treated postharvest with UVB light or sunlight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(16):8724-32.
20. Satora L, Pach D, Butryn B, Hydzik P, Balicka-Ślusarczyk B. Fly agaric (*Amanita muscaria*) poisoning, case report and review. *Toxicon*. 2006;45(7):941-3.
21. Stamets P. Psilocybin Mushrooms of the World. Berkeley: Ten Speed Press; 1996.
22. Kaya E, Yilmaz I, Sinirlioglu ZA, Karahana S, Bayramd R, Yaykaslie KO, et al. Amanitin and phalloxin concentration in *Amanita phalloides* var. alba mushroom. *Toxicon*. 2013;76:225-33.
23. Asatiani MD, Kachlishvili ET, Khardziani TS, Metreveli EM, Mikiashvili NA, Songulashvili GG, et al. Basidiomycetes as a source of antioxidants, lectins, polysaccharides and enzymes. *Journal of Biotechnology*. 2008;136:717.
24. Dr. Brainfish. *Psilocybe cubensis* Thai cultivadas en arroz integral, Tailandesas [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2b/Psilocybe_Cubensis_Thai.jpg.
25. Archenzo. *Amanita phalloides*. Piacenza's mountains [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/99/Amanita_phalloides_1.JPG.
26. Lebrac. Gifthäublinge (*Galerina marginata*) 2006 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a3/Gifth%C3%A4ublinge.jpg.
27. Santos LF, Zanatta AL, Thomaz-Soccol V, Torres MF, Rubel R, Bonatto SJR, et al. Hypolipdemic and antiatherosclerotic potential of *Pleurotus ostreatus* cultivated by submerged fermentation in the high-fat diet fed rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (Seoul Print). 2013;18:201-8.
28. Rubel R, Dalla Santa HS, Fernandes LC, Bonatto SJR, Bello S, Figueiredo BC, et al. Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss:Fr) Karst used as a dietary supplement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2011; 27:1083-9.
29. Enshasy HAE, Hatti-Kaul R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*. 2013 Dec;31(12):668-77.

30. Zhang Z, Guoying LV, Pan H, Leifa F, Soccol CR, Pandey A. Production of Powerful Antioxidant Supplements via Solid-State Fermentation of Wheat (*Triticum aestivum* Linn.) by *Cordyceps militaris*. Food Technology and Biotechnology. 2012;50:32-9.
31. Zhang Z, Guoying LV, Pan H, Santos LFD, Fan M, Soccol CR, et al. Antidiabetic activities of ethanol extract of dry matters of culture broth of *Coriolus versicolor* in submerged culture. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2011;54:701-8.
32. Pana D, Zhangb D, Wuc J, Chena C, Xua Z, Yangb H, et al. A novel proteoglycan from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies protects kidney function and ameliorates diabetic nephropathy via its antioxidant activity in C57BL/6 db/db mice. Food and Chemical Toxicology. 2014;63:111-8.
33. Santos LFD, Rubel R, Bonatto SJR, Zanatta AL, Aikawa J, Yamaguchi AA, et al. *Cordyceps sinensis* biomass produced by submerged fermentation in high-fat diet feed rats normalizes the blood lipid and the low testosterone induced by diet. EXCLI Journal. 2012;11:767-75.
34. Nie S, Zhang H, Li W, Xie M. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2013;1(1):10-20.
35. Kutschera W, Rom W. Otzi. The prehistoric Iceman. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. 2000 Apr;164-165:12-22.
36. Rajarathnam S, Shashirekha MN. Mushrooms and truffles. Use of Wild Mushrooms. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition; 2003. p. 4048-54.
37. Vargas-Isla R, Ishikawa NK, Py-Daniel V. Contribuições etnomicológicas dos povos indígenas da Amazônia. Biota Amazônia. 2013;3(1):58-65.
38. Paterson RRM. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry. 2006;67:1985-2001.
39. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. Biotechnology Annual Review. 2007;13:265-301.
40. Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P. The role of edible mushrooms in health: evaluation of the evidence. Journal of Functional Foods. 2012;4(4):687-709.
41. Oba K, Kobayashi M, Matsui T, Kodera Y, Sakamoto J. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. Anticancer Research. 2009;29(7):2739-45.
42. Grube BJ, Eng ET, Kao YC, Kwon A, Chen S. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. The Journal of Nutrition. 2001;131(12):3288-93.
43. Jiang J, Grieb B, Thyagarajan A, Sliva D. Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling. International Journal of Molecular Medicine. 2008;21(5):577-84.

44. Oba K, Teramukai S, Kobayashi M, Matsui T, Kodera Y, Sakamoto J. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curative resections of gastric cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*. 2007;56(6):905-11.
45. Sakamoto J, Morita S, Oba K, Matsui T, Kobayashi M, Nakazato H, et al. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*. 2006;55(4):404-11.
46. Yu L, Fernig DG, Smith JA, Milton JD, Rhodes JM. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Research*. 1993;53(19):4627-32.
47. Lee SH, Hwang HS, Yun JW. Antitumor activity of water extract of a mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 human colon cancer cells. *Phytotherapy research: PTR*. 2009;23(12):1784-9.
48. Ahn WS, Kim DJ, Chae GT, Lee JM, Bae SM, Sin JI, et al. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2004;14(4):589-94.
49. Chen X, Wang W, Li S, Xue J, Fan L, Sheng Z, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80(3):944-8.
50. Ren G, Zhao Y-P, Yang L, Fu C-X. Anti-proliferative effect of clitocine from the mushroom *Leucopaxillus giganteus* on human cervical cancer HeLa cells by inducing apoptosis. *Cancer Letters*. 2008;262(2):190-200.
51. Noguchi M, Kakuma T, Tomiyasu K, Kurita Y, Kukihiro H, Konishi F, et al. Effect of an extract of *Ganoderma lucidum* in men with lower urinary tract symptoms: a double-blind, placebo-controlled randomized and dose-ranging study. *Asian Journal of Andrology*. 2008;10(4):651-8.
52. Jiang J, Slivova V, Valachovicova T, Harvey K, Sliva D. *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3. *International Journal of Oncology*. 2004;24(5):1093-9.
53. Stanley G, Harvey K, Slivova V, Jiang J, Sliva D. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta1 from prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;330(1):46-52.
54. Eckhardt SG, Baker SD, Britten CD, Hidalgo M, Siu L, Hammond LA, et al. Phase I and pharmacokinetic study of irofulven, a novel mushroom-derived cytotoxin, administered for five consecutive days every four weeks in patients with advanced solid

malignancies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(24):4086-97.

55. Johnson E, Førland DT, Saetre L, Bernardshaw SV, Lyberg T, Hetland G. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* murill on release of cytokines, chemokines and leukocyte growth factors in human blood ex vivo and in vivo. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009;69(3):242-50.

56. Volman JJ, Mensink RP, Van Griensven LJLD, Plat J. Effects of alpha-glucans from *Agaricus bisporus* on ex vivo cytokine production by LPS and PHA-stimulated PBMCs; a placebo-controlled study in slightly hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010;64(7):720-6.

57. Ramberg JE, Nelson ED, Sinnott RA. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal*. 2010 Nov;9:54.

58. Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH, et al. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF-kappaB and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;114(3):307-15.

59. Hsu C-H, Liao Y-L, Lin S-C, Hwang K-C, Chou P. The mushroom *Agaricus blazei* Murill in combination with metformin and gliclazide improves insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2007;13(1):97-102.

60. Khatun K, Mahtab H, Khanam PA, Sayeed MA, Khan KA. Oyster mushroom reduced blood glucose and cholesterol in diabetic subjects. *Mymensingh Medical Journal: MMJ*. 2007;16(1):94-9.

61. Mee-Hyang K, Kwon S-T, Kwon S-H, Ma M-S, Park YI. Lowering effects in plasma cholesterol and body weight by mycelial extracts of two mushrooms: *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *San'oeb Misaengmul Haghoeji*. 30(4):402-9.

62. Mori K, Inatomi S, Ouchi K, Azumi Y, Tuchida T. Improving effects of the mushroom Yamabushitake (*Hericium erinaceus*) on mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research: PTR*. 2009;23(3):367-72.

63. Kawagishi H, Zhuang C. Compounds for dementia from *Hericium erinaceum*. *Drugs of the Future*. 2008;33(2).

64. Hsu C-H, Hwang K-C, Chiang Y-H, Chou P. The mushroom *Agaricus blazei* Murill extract normalizes liver function in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2008;14(3):299-301.

65. Zhou S, Gao Y, Chan E. Clinical Trials for Medicinal Mushrooms: Experience with *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Lingzhi Mushroom). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2005;7(1-2):111-8.

66. El Dine RS, El Halawany AM, Ma C-M, Hattori M. Inhibition of the dimerization and active site of HIV-1 protease by secondary metabolites from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. *Journal of Natural Products*. 2009;72(11):2019-23.
67. Faccin LC, Benati F, Rincão VP, Mantovani MS, Soares SA, Gonzaga ML, et al. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology*. 2007;45(1):24-8.
68. Sun W, Yu J, Shi Y-M, Zhang H, Wang Y, Wu B-B. [Effects of *Cordyceps* extract on cytokines and transcription factors in peripheral blood mononuclear cells of asthmatic children during remission stage]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao (Journal of Chinese Integrative Medicine)*. 2010;8(4):341-6.
69. Kim TI, Park SJ, Choi CH, Lee SK, Kim WH. [Effect of ear mushroom (*Auricularia*) on functional constipation]. *Taehan Sohwagi Hakhoe chi (The Korean Journal of Gastroenterology)*. 2004;44(1):34-41.
70. Chen SN, inventor. Production method for solid cultured active mushroom mycelium and fruit-body metabolites (AMFM). United States patent 2009/0098620; 2009 Apr 16.
71. Dalla-Santa HS, Rubel R, Vitola FMD, Rodrigues-Leon JA, Dalla-Santa OR, Brand D, et al. Growth Parameters of *Agaricus brasiliensis* Mycelium on Wheat Grains in Solid-state Fermentation. *Biotechnology (Faisalabad Print)*. 2012;11:144-53.
72. Chimilovski JS, Habu S, Teixeira RFB, Thomaz-Soccol V, Nosedá MD, Pandey A, et al. Antitumoral activities of exopolysaccharide of *Grifola frondosa* produced by submerged fermentation using sugarcane and soybean molasses as carbon source. *Food Technology and Biotechnology*. 2011;49:359-63.
73. Steinert E. *Ganoderma lucidum* 2013 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Ganoderma_lucidum_01.jpg.
74. Yang S. The Divine Farmer's Materia Medica: A Translation of the Shen Nong Ben Cao Jing. Boulder: Blue Poppy Enterprises; 1998. 236 p.
75. Shizen L. Compendium of materia medica: bencao gangmu. Beijing: Foreign Languages Press; 2003.
76. Yu Z-R, Wang B-J. Inventors. Method and system for continuous separation and purification of ganoderic acids and polysaccharides. United States patent US20130075336A1; 2013 Mar 28.
77. Rubel R, Santa HSD, Fernandes LC, Filho JHCL, Figueiredo BC, Di Bernardi R, et al. High Immunomodulatory and Preventive Effects Against Sarcoma 180 in Mice Fed with Ling Zhi or Reishi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae) Mycelium. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2008;10:37-48.

78. Dudhgaonkar S, Thyagarajan A, Sliva D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *International Immunopharmacology*. 2009;9(11):1272-80.
79. Jesenak M, Banovcin P, Rennerov Z, Majtan J. β -Glucans in the treatment and prevention of allergic diseases. *Allergologia et Immunopathologia*. 2012;in press.
80. ANVISA. Consulta Pública nº 15, 14 May 2012 [Internet]. [Cited 2016 Nov 2]. Available from: portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/61f704004fa210b897f0f79a71dcc661/consulta+p%c3%bablica+n%c2%b0+15+secol.pdf?mod=ajperes.
81. Tung NT, Cuong TD, Hung TM, Lee JH, Woo MH, Choi JS, et al. Inhibitory effect on NO production of triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013;23(5):1428-32.
82. Lee I, Kim J, Ryoo I, Kim Y, Choo S, Yoo I, et al. Lanostane triterpenes from *Ganoderma lucidum* suppress the adipogenesis in 3T3-L1 cells through down-regulation of SREBP-1c. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010;20(18):5577-81.
83. Yue Q-X, Song X-Y, Ma C, Feng L-X, Guan S-H, Wu W-Y, et al. Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. *Phytomedicine*. 2010;17(8-9):606-13.
84. Zhu K, Nie S, Li C, Lin S, Xing M, Li W, et al. A newly identified polysaccharide from *Ganoderma atrum* attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;57:142-50.
85. Tomoda M, Gonda R, Kasahara Y, Hikino H. Glycan structures of ganoderans b and c, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Phytochemistry*. 1986;25(12):2817-20.
86. Song YS, Kim S-H, Sa J-H, Jin C, Lim C-J, Park E-H. Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;90(1):17-20.
87. Thyagarajan A, Jiang J, Hopf A, Adamec J, Sliva D. Inhibition of oxidative stress-induced invasiveness of cancer cells by *Ganoderma lucidum* is mediated through the suppression of interleukin-8 secretion. *International Journal of Molecular Medicine*. 2006;18(4):657-64.
88. Wan JM-F, Sit W-H, Louie JC-Y. Polysaccharopeptide enhances the anticancer activity of doxorubicin and etoposide on human breast cancer cells ZR-75-30. *International Journal of Oncology*. 2008;32(3):689-99.
89. Deutsche Gesellschaft Für Mykologie. *Cordyceps militaris* 2000 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: dgfm-ev.de/index.php?id=pdj_2007.
90. Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu X. What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)? *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*. 2010;1(4):228-36.

91. Das SK, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*. 2010;81(8):961-8.
92. Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu X. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycological Progress*. 2012;11(3):599-614.
93. Lo H-C, Hsieh C, Lin F-Y, Hsu T-H. A Systematic Review of the Mysterious Caterpillar Fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao (Dōng Chóng Xià Cǎo) and Related Bioactive Ingredients. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2013;3(1):16-32.
94. Zhong S, Pan H, Leifa F, Wu Y, Binod P, Pandey A, et al. Advances in research of polysaccharides in *Cordyceps* species. *Food Technology and Biotechnology*. 2009;47:304-12.
95. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmacological Problems. *Advance Access Publication*. 2007;5(1):3-15.
96. Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FMD, Buchi D, Di Bernardi R, Moreno AN, et al. *Agaricus brasiliensis* mycelium supplementation in Sarcoma 180 tumor-bearing mice reverses the immune response induced by the tumor. *Food and Agricultural Immunology*. 2012;212:1-14.
97. Wilson N. *Agaricus subrufescens*. 2002 [Internet] [Cited 2016 Nov 3]. Available from: <http://mushroomobserver.org/549>.
98. Ko J-L, inventor. Uses of an Immunomodulatory Protein (GMI) from *Ganoderma microsporum*. Mycomagic Biotechnology Co., assignee. United States patent US8476238B2; 2013 Jul 13.
99. Fares F, Sharvit L, Wasser SP, inventors. Extracts of *Cyathus striatus* mushrooms, pharmaceutical compositions comprising them and a new *Cyathus striatus* strain. WO2011151831A1; 2011 Dec 8.
100. Ales P, Escut A, Choulot J-C, inventors. Polysaccharide Extract of *Lentinus* and Pharmaceutical, Cosmetic or Nutraceutical Compositions Comprising Such an Extract. US8383127B2; 2013 Feb 26.
101. Sandewicz IM, Russ JG, Zhu VX, inventors. Anhydrous cosmetic compositions containing mushroom extract. US6645502B2; 2003 Nov 11.
102. Chen J-C, Chen C-N, Sheu S-J, inventors. Preparation and compositions for *Antrodia camphorata* mycelium biologically active material. US20030148517A1. 2003 Aug 7.
103. Ikekawa T, Ikekawa A, Shimada F, inventors. Physiologically active substance originating in mushrooms, process for producing the same and drugs. US6783771 B2; 2004 Aug 31.
104. Donatini B, inventor. Novel pharmaceutical or dietetic mushroom-based compositions. US20020164352A1; 2002 Nov 7.

105. Wong K-P, inventor. Compositions containing an active fraction isolated from *Tricholoma conglobatum* and methods of use. Compositions containing an active fraction isolated from *Tricholoma conglobatum* and methods of use. WO2002047705 A2; 2002 Jun 20.
106. Wong K-P, inventor. Compositions containing an active fraction isolated from *Scutellariae barbatae* and methods of use. Patent 20020094350; 2002.
107. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology. 1929;10:226-36.
108. Novak R, Shlaes DM. The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. Current Opinion in Investigational Drugs. 2010;11(2).
109. Kilaru S, Collins CM, Hartley AJ, Bailey AM, Foster GD. Establishing Molecular Tools for Genetic Manipulation of the Pleuromutilin-Producing Fungus *Clitopilus passeckerianus*. Applied and Environmental Microbiology. 2009;75(22):7196-204.
110. Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sönksen CP, Ludvigsen S, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature. 2005;437:975-80.
111. Jagadish LK, Krishnan VV, Shenbhagaraman R, Kaviyarasan V. Comparative study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach before and after boiling. African Journal of Biotechnology. 2009;8(4).
112. Soboleva AI, Krasnopol'skaia LM, Fedorova GB, Katrukha GS. [Antibiotic properties of the strains of the basidiomycete *Lentinus edodes* (Berk.) sing]. Antibiotiki i khimioterapii (Antibiotics and Chemotherapy). Ministerstvo meditsinskoï i mikrobiologicheskoi promyshlennosti SSSR. 2006;51(7):3-8.
113. Hearst R, Nelson D, Mccollum G, Millar BC, Maeda Y, Goldsmith CE, et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. Complementary Therapies in Clinical Practice. 2009;15(1):5-7.
114. Venturini ME, Rivera CS, Gonzalez C, Blanco D. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. Journal of Food Protection. 2008;71(8):1701-6.
115. Martins PR, Gameiro MC, Castoldi L, Romagnoli GG, Lopes FC, Pinto AVFDS, et al. Polysaccharide-rich fraction of *Agaricus brasiliensis* enhances the candidacidal activity of murine macrophages. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2008;103(3):244-50.
116. Bernardshaw S, Hetland G, Ellertsen LK, Tryggestad AMA, Johnson E. An Extract of the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill Differentially Stimulates Production of Pro-inflammatory Cytokines in Human Monocytes and Human Vein Endothelial Cells in vitro. Inflammation. 2005;29(4-6):147-53.

117. Bernardshaw S, Hetland G, Grinde B, Johnson E. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill protects against lethal septicemia in a mouse model of fecal peritonitis. *Shock* (Augusta, Ga). 2006;25(4):420-5.
118. Ozen T, Darcan C, Aktop O, Turkekul I. Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the black sea region of Turkey. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2011;14(2):72-84.
119. Öztürk M, Duru ME, Kivrak S, Mercan-Doğan N, Türkoglu A, Özler MA. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: a comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2011;49(6):1353-60.
120. Tambekar DH, Sonar TP, Khodke MV, Khante BS. The Novel Antibacterials from Two Edible Mushrooms: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju*. *International Journal of Pharmacology*. 2006;2(5):584-7.
121. Kawagishi H, Suzuki H, Watanabe H, Nakamura H, Sekiguchi T, Murata T, et al. A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1474(3):299-308.
122. Francia C, Rapior S, Courtecuisse R, Siroux Y. Current Research Findings on the Effects of Selected Mushrooms on Cardiovascular Diseases. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999;1(2):169-72.
123. Vítola FMD, Adjam E, Fernandes MBA, Fernandes LC, Meijer AAR, Thomaz-Soccol V, et al. In vitro antiparasitic activity of quinones extracts, obtained from the submerged mycelial cultivation broths of three edible macromycete species, against *Leishmania (L.) infantum*. IV Simpósio Internacional Sobre Cogumelos No Brasil (IV SICOG) e III Simpósio Nacional Sobre Cogumelos Comestíveis; Caxias do Sul. Brasília: EMBRAPA; 2008. p. 128.
124. Fendrich RC, Vítola FMD, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. Produção e caracterização de compostos com atividade anti-*Leishmania* produzidos por macromicetos. XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul. Foz do Iguaçu; 2009. p. 986.
125. Vítola FMD, Adjam E, Fernandes MBA, Meijer AAR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. In vitro antiparasitic activity of quinones extracts, obtained from the submerged mycelial cultivation broths of three macromycete species of the genus *Ganoderma*, against *Leishmania (L.) infantum*. IV Simpósio Internacional Sobre Cogumelos No Brasil (IV SICOG) e III Simpósio Nacional Sobre Cogumelos Comestíveis; Caxias do Sul: EMBRAPA; 2008. p. 193.
126. Nordbring-Hertz B, Jansson H-B, Tunlid A. *Nematophagous Fungi*. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.

127. Barron GL. The nematode-destroying fungi. Guelph: Canadian Biological Publ.; 1977. 140 p.
128. Gray GD. Genetic resistance to haemonchosis in sheep. *Parasitology Today* (Personal ed). 1987;3(8):253-5.
129. Padilha T. Estratégia para o controle da verminose gastrointestinal de bovinos de leite na região sudeste do Brasil. Simpósio Sobre Controle de Parasitos 1; Campinas/São Paulo: CATI; 1996. p. 50-6.
130. Li T, Zhang K, Liu X. Taxonomy of nematophagous fungi. Beijing: Chinese Scientific & Technological Publication; 2000.
131. Luo H, Li X, Li G, Pan Y, Zhang K. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a Nematode-Attacking Device. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(4):2982-7.
132. Descazeaux J, Capelle R. Contribution à l'étude des champignons prédateurs des larves de nématodes parasites des animaux domestiques. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*. 1939;12:284-8.
133. Roubaud É, Deschiens R. Action des Hyphomycetes Prédateurs Sur Les Larves de Synthétocauls et de Bunostomes. Masson; 1941.
134. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S, Maia AS, Magalhães ACM. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium elyptosporum* em condições de laboratório. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 1992;44(6):521-6.
135. Araújo JV, Stephano MA, Sampaio WM. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*, a nematode trapping fungus. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2000;9:55-60.
136. Falbo MK, Soccol VT, Sandini IE, Vicente VA, Robl D, Soccol CR. Isolation and characterization of the nematophagous fungus *Arthrobotrys conoides*. *Parasitology Research*. 2013;112(1):177-85.
137. Thomaz-Soccol V, Souza FPD, Sotomaior C, Castro EA, Milczewski V, Mocelin G, et al. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2004;47(1):41-7.
138. Thomaz-Soccol V, Sotomaior C, Castro EA, Souza FP. Situação da resistência dos helmintos gastrintestinais de ovinos aos anti-helmínticos, no Estado do Paraná. 1º Simpósio Sobre Controle de Parasitos. Campinas/São Paulo; CATI; 1996. p. 79-89.
139. Chartier C, Soubirac F, Pors I, Silvestre A, Hubert J, Couquet C, et al. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *Journal of Helminthology*. 2001;75(4):325-30.

140. Sangster NC. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*. 1999;29(1):115-24.
141. Van Wyk JA, Stenson MO, Van Der Merwe JS, Vorster RJ, Viljoen PG. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort J Vet Res*. 1999 Dec;66(4):273-84.
142. Eysker M, Bakker N, Van Der Hall YA, Van Hecke I, Kooyman FNJ, Van Der Linden D, et al. The impact of daily *Duddingtonia flagrans* application to lactating ewes on gastrointestinal nematode infections in their lambs in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*. 2006;141(1-2):91-100.
143. Faessler H, Torgerson PR, Hertzberg H. Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. *Veterinary Parasitology*. 2007;147(1-2):96-102.
144. Mota MDA, Campos AK, Araújo JVD. Biological control of helminth parasites of animals: current stage and future outlook. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2003;23(3):93-100.
145. Dalla Santa HS, Rubelb R, Fernandes LC, Bonatto SJR, Bello SR, Monteiro MC, Khalil NM, Dalla Santa OR, Gern JC, Soccol CR. *Agaricus brasiliensis* enriched functional product promotes in mice increase in HDL levels and immunomodulate to Th1 CD4+T subsets. *A. brasiliensis* functional product and biological benefics. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2010;4(4):957-70.
146. Rubel R, Dalla Santa HS, Bonatto SJR, Bello S, Fernandes LC, Di Bernardi R, et al. Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Leyss: Fr) Karst. Triggers Immunomodulatory Effects and Reduces Nitric Oxide Synthesis in Mice. *Journal of Medicinal Food*. 2010;13:142-8.
147. Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(1):4-19.
148. Bellettini MB, Vitola FMD, Santos LF, Thomaz-Soccol V, Soccol CR, editors. Produção de biomassa e atividade antioxidante em cultivo micelial submerso de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus djamor* utilizando o caldo de hidratação de estirpe de pupunha seco como substrato. VII International Symposium on Mushrooms in Brazil. Manaus/Brasília: Embrapa; 2013.
149. Vitola FMD, Faraco V, Bellettini MB, Santos LF, Thomaz-Soccol V, Soccol CR, editors. Screening of superoxide dismutase activity inducers in the submerged mycelial cultivation of *Pleurotus ostreatus*. In: VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, 2013, Manaus. Anais do VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013. v. 7. p. 385.

150. Bellettini MB, Vitola FMD, F. SL, Santos LF, Thomaz-Soccol V, Soccol CR, editors. Fatores significativos para o desenvolvimento de *Pleurotus djamor* no suco de pupunha em relação a atividade antioxidantes, concentração proteica e de biomassa em fermentação micelial submersa. In: VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, 2013, Manaus. Anais do VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013. v. 7. p. 399.
151. Berovič M, Habijanič J, Zore I, Wraber B, Hodžar D, Boh B, Pohleven F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. Journal of Biotechnology. 2003;103(1):77-86.
152. ATCC. The Global Bioresource Center, c. 2013 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: atcc.org.
153. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 1959;31(3):426-8.
154. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. 1956;28(3):350-6.

10

CAPÍTULO

DA PLANTA AO MEDICAMENTO: CASO DE ESTUDO DAS PROTEINASES DE CARICACEAE COM ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

Miriam T. P. Lopes
Abraham V. Schnaiderman
Elsa Uribe
Carlos E. Salas

10.1 INTRODUÇÃO

Estrutura e propriedades bioquímicas das proteinases vegetais. Função das proteinases em plantas

As proteinases das plantas são responsáveis pelo metabolismo proteico constituído por um conjunto de reações enzimáticas essenciais à vida. Proteinase, peptidase, protease ou enzima proteolítica são os vários nomes atribuídos às enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. Dentre essas, as

exoproteínases atuam nos extremos das proteínas-substrato, liberando o aminoácido N-terminal (aminopeptidase) ou carboxiterminal (carboxipeptidase), e as endoproteínases hidrolisam ligações peptídicas no interior da proteína. A classificação das endoproteínases se baseia no tipo de resíduo enzimático que participa da reação. Assim, foram descritas as serino proteínases, que possuem um resíduo serino no sítio ativo, cisteíno, aspartato e glutamato-proteínases, cada grupo contendo o resíduo aminoácido característico. Ainda, um grupo dessas enzimas requer um metal para exercer a catálise (metaloproteínases). Nas serino e cisteíno-proteínases, o nucleófilo que participa na reação de hidrólise é o próprio aminoácido, ao passo que uma molécula de água é o nucleófilo durante as reações com aspartato, glutamato e as metaloproteases, sugerindo uma origem evolutiva diferente para esses grupos. Existe, ainda, um número crescente de proteínases cuja classificação em algum desses grupos é inadequada, o que indica a necessidade de uma reformulação dos critérios utilizados até agora.

O sistema elaborado por Rawlings e Barrett¹ utilizando critérios evolutivos e estruturais para classificar as proteínases em famílias e clãs (classes) representa uma alternativa de ordenamento. A base de dados MEROPS^{*} registra cada proteínase com base nesses parâmetros e se encontra disponível na internet. O sistema MEROPS inclui, além das cinco categorias mencionadas, as categorias asparagino, treonino, mistas e proteínases desconhecidas. Em outubro de 2013, a versão 9.9 da base de dados continha 413.834 sequências composta de 245 famílias e 61 clãs e fornece informação estrutural através de *links* para 707 estruturas (Protein Data Bank – PDB)^{**}.

Os dados gerais da versão publicada em 11 de outubro de 2013 pelo site MEROPS se encontram na Tabela 10.1, incluindo dez categorias de proteínases, o número de sequências para cada grupo, o identificador, quando disponível, para cada grupo e as sequências com estrutura determinada (PDB).

Tabela 10.1 Classificação geral das proteínases de acordo com a base de dados MEROPS^{***}

| NÚMERO DE REGISTROS PARA AS VÁRIAS CLASSES CATALÍTICAS | | | | |
|--|------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| TIPO CATALÍTICO | SEQUÊNCIAS | IDENTIFICADORES | IDENTIFICADORES COM NÚMERO EC | IDENTIFICADORES COM ENTRADA PDB |
| Aspártico | 18.576 | 311 | 32 | 52 |
| Cisteína | 90.153 | 934 | 73 | 153 |

* Ver <http://merops.sanger.ac.uk/>.

** Disponíveis através de <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.

*** Ver MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/statistics_index?type=P).

| NÚMERO DE REGISTROS PARA AS VÁRIAS CLASSES CATALÍTICAS | | | | |
|--|------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| TIPO CATALÍTICO | SEQUÊNCIAS | IDENTIFICADORES | IDENTIFICADORES COM NÚMERO EC | IDENTIFICADORES COM ENTRADA PDB |
| Glutâmico | 383 | 7 | 2 | 3 |
| Metalo | 141.384 | 1.044 | 129 | 194 |
| Asparagina | 3.996 | 24 | 1 | 19 |
| Misto | 679 | 5 | 0 | 3 |
| Serina | 136.164 | 1.703 | 113 | 251 |
| Treonina | 14.958 | 99 | 4 | 29 |
| Desconhecido | 7.537 | 17 | 0 | 3 |
| Não classificados | 4 | 3 | 24 | – |
| Total | 413.834 | 4.147 | 378 | 707 |
| Total de Famílias | | | | 245 |
| Total de clãs | | | | 61 |

As serino e metalo-proteinases representam 32% a 34% das anotações, seguidas pelas cisteíno-proteinases (21%), aspartato-proteinases (4%) e menores proporções dos outros grupos. A importância das enzimas proteolíticas não desmerece a relevância dos inibidores naturais, muitos dos quais são, também, proteínas que interagem com proteinases-alvos, modulando a atividade destas últimas^{2,3}.

Neste capítulo são abordadas as proteinases de plantas, do ponto de vista funcional, e, em uma segunda parte, as possíveis atividades farmacológicas dessas macromoléculas, mais especificamente a atividade cicatrizante de cisteíno-proteases do látex de *Vasconcellea cundinamarzensis*.

10.2 PLANTAS LACTÍFERAS E ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

As plantas lactíferas (> 20.000) possuem uma rede de condutos distribuídos nos diversos órgãos através dos quais circula o látex. O látex é uma suspensão que contém vários tipos de moléculas, terpenos, alcaloides, borrachas, cardenolidos e vários tipos de proteínas⁴. Embora se atribua ao látex uma função essencialmente protetora, este também poderia servir de veículo de excreção de metabólitos. Além das moléculas menores encontradas no látex (metabólitos secundários), que exibem atividade tóxica contra animais e insetos, encontramos também proteínas, algumas das quais possuem reconhecida atividade enzimática.

Em *Hevea brasiliensis*, árvore produtora da borracha, existe a heveína, uma proteína de menor tamanho (4,7 KDa) semelhante a uma aglutinina encontrada em *Urtica dioica*, que é capaz de se aglutinar com quitina, sugerindo ação antifúngica e inseticida⁵. Ainda no látex de *H. brasiliensis* se encontram enzimas capazes de produzir terpenos, moléculas^{1,4} polisopreno precursores da borracha^{6,7}. É possível que a borracha também aja como defensivo através das propriedades aderentes que imobilizam o predador.

Outro grupo de lactíferas possui enzimas proteolíticas, e nesse caso as enzimas são excretadas após injúria da planta. Ao menos quatro grupos de proteinases foram descritas nessas lactíferas: cisteíno, serino, metalo e aspartato-proteinases. Uma revisão atualizada das enzimas identificadas no látex de *Vasconcellea cundinamarzensis*⁸ mostra que cisteíno-proteinases, junto às serino proteinases, compõem o grupo majoritário nessas plantas. Nas *Vasconcelleas*, a hidrólise proteica faz parte do processo intra e extracelular e inclui a degradação de proteínas de reserva durante a germinação da semente, maturação de frutos, ativação de proenzimas, degradação de enzimas defeituosas ou que cumpriram sua função metabólica para disponibilizar novamente aminoácidos para a síntese de novas proteínas⁹. As enzimas proteolíticas participam do desenvolvimento, morfogênese, biogênese celular, senescência celular e na morte celular programada, de maneira semelhante ao que sucede em animais. A ação proteolítica também inclui os processos de sinalização e respostas ao estresse biótico e abiótico, gerando uma resposta defensiva^{3,10,11}.

Em *Caricaceae* a resposta defensiva se inicia com a liberação de látex no sítio da injúria, que por um intervalo relativamente curto (dois a cinco minutos) escorre pela ferida, produzindo um coágulo, que atua como barreira protetora no local da lesão, impedindo a perda progressiva do látex. No transcurso de três a sete dias é possível comprovar a formação de uma crosta no lugar da lesão. A Figura 10.1A ilustra a evolução desse processo em um intervalo de 20 dias. Observa-se que o sistema de cicatrização em *Caricaceae* emula o que ocorre em mamíferos (Figura 10.1A-C). Entretanto, no fruto da planta, por representar o estágio final na transformação do órgão, o processo regenerativo não se completa de maneira semelhante ao que ocorre em mamíferos; pelo contrário, observa-se no fruto lesado, quando coletado antes do amadurecimento (Figura 10.1B), que há um atraso da maturação (área mais verde) ao redor da lesão. Isso se explica conforme o descrito por Azarkan et al.¹², que demonstraram um aumento na atividade de enzimas proteolíticas após injúria, de modo que resulta evidente que as enzimas proteolíticas retardam o amadurecimento do fruto. A observação

inversa é reconhecida popularmente, quando o fruto se encontra próprio para o consumo, apresenta atividade proteolítica residual. Observações não publicadas confirmam que quando os frutos pós-coleta são tratados com soluções contendo enzimas proteolíticas, podem ter sua vida útil prolongada em até 50%, sem deterioração visível.

| TOTALS FOR ALL CATALYTIC TYPES | | | | |
|--------------------------------|-----------|-------------|-----------------------------|------------------------------|
| Catalytic Type | Sequences | Identifiers | Identifiers with EC numbers | Identifiers with PDB entries |
| Aspartic | 18576 | 311 | 32 | 52 |
| Cysteine | 90153 | 934 | 73 | 153 |
| Glutamic | 383 | 7 | 2 | 3 |
| Metallo | 141384 | 1044 | 129 | 194 |
| Asparagine | 3996 | 24 | 1 | 19 |
| Mixed | 679 | 5 | 0 | 3 |
| Serine | 136164 | 1703 | 113 | 251 |
| Threonine | 14958 | 99 | 4 | 29 |
| Unknown | 7537 | 17 | 0 | 3 |
| Unclassifiable | 4 | 3 | 24 | - |
| Grand Total | 413834 | 4147 | 378 | 707 |
| Total Families | | | | 245 |
| Total clans | | | | 61 |

Figura 10.1 (A) Fruto de Vasconcellea cundinamarcensis, 20 dias após extração do látex; (B) fruto de Vasconcellea cundinamarcensis, 10 dias após extração de látex; (C) cicatrização em indivíduo após trauma físico.

10.3 CICATRIZAÇÃO EM LACTÍFERAS VERSUS MAMÍFEROS

Para melhor entender o processo de coagulação em plantas, podemos utilizar os conceitos descritos para a hemostasia, antes e durante a coagulação, em mamíferos. Primeiramente, previamente à coagulação, o sangue deve se manter em estado líquido, sem formar trombos que impeçam sua livre distribuição no sistema circulatório. O vaso sanguíneo, revestido internamente pelo endotélio, impede a ativação plaquetária (essencial à coagulação), produzindo moléculas inibitórias dessa ativação (prostaciclina, NO, trombomodulina e heparina entre outras) e, também, produzindo protease ativadora de plasmina (t-pA) para dissolver eventuais coágulos de fibrina (trombos) que possam interferir na fluidez do sangue. O equilíbrio é alterado quando ocorre a ruptura do endotélio, expondo a camada subendotelial de natureza trombogênica por possuir sítios para adesão (colágeno, miofibrila) das

plaquetas, iniciando-se, assim, a ativação plaquetária. A presença do fator tissular produzido pelos fibroblastos subendoteliais inicia a coagulação sanguínea, mediada pela ativação proteolítica (serino protease) do fator VII presente no sangue. O conjunto de reações que se sucedem, envolvendo os fatores VIIa, Xa, trombina e fator XIIIa (serino proteases, exceto o fator XIIIa), levam à formação do coágulo de fibrina. O processo iniciado pelo fator tissular é conhecido como cascata de coagulação da via extrínseca, já que existe, também, uma forma alternativa para iniciar a coagulação denominada de via intrínseca. A cascata da coagulação é um processo hierarquizado, sequencial, em que um precursor inicialmente ativado ativa o precursor seguinte da cascata gerando um efeito multiplicador, podendo uma mesma enzima participar de múltiplas reações de ativação. A Figura 10.2 apresenta uma esquematização da cascata de coagulação com as vias extrínseca e intrínseca.

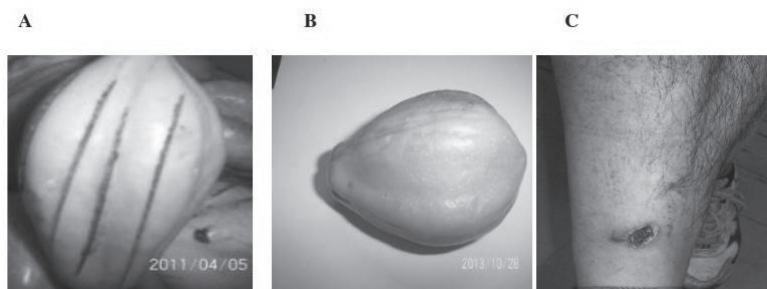


Figura 10.2 Esquema simplificado da coagulação sanguínea em mamíferos.

Nas plantas lactíferas ocorre uma situação semelhante à descrita: o látex no estado líquido deve permanecer fluido circulando pelos canais lactíferos, garantindo a distribuição de metabólitos na planta. Desconhece-se o tipo de substâncias que impedem a coagulação do látex; entretanto, várias substâncias já descritas poderiam servir como potenciais inibidores. É possível, também, que moléculas ativadoras da coagulação se encontrem isoladas do látex e que, no momento da lesão na planta, esses ativadores entrem em contato com o látex, como ocorre no sangue. Após a injúria, o látex é liberado pela área lesada, durante um período não superior a três a seis minutos. Durante

esse processo, o látex que fica aderido à área lesada é coagulado, passando do estado líquido ao sólido.

O fenômeno de gelificação/tamponamento em ductos de resinas e lactíferos já foi reconhecido há mais de 20 anos^{13,14}, mas os autores não conseguiram identificar os mecanismos que medeiam a transformação.

Em nosso modelo de Caricaceae, amostras do látex retiradas da lesão durante a coagulação evidenciam a presença de enzimas proteolíticas no fluido, cujas atividades sofrem modificação durante esse processo. Ao mesmo tempo, o perfil eletroforético de proteínas observado por SDS-PAGE também é modificado. Esses resultados são interpretados como se, durante a coagulação, várias atividades proteolíticas fossem sequencialmente ativadas para metabolizar componentes proteicos, gerando um coágulo que age como barreira protetora na área lesada, impedindo a saída de fluidos e a possível entrada de agentes patogênicos ou predadores¹⁵. A Figura 10.3 mostra as variações da atividade proteolítica durante o intervalo em que o látex é coagulado.

Em mamíferos, os eventos que sucedem a coagulação do sangue correspondem ao processo de cicatrização tecidual, fenômeno que pode ser dividido em três etapas: (a) inflamação; (b) proliferação; e (c) modelagem da matriz celular. Dependendo da gravidade da lesão, esse processo pode demorar de três semanas a dez meses, quando não existem agentes que perturbem

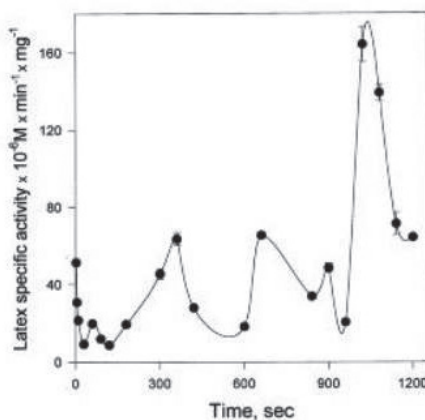


Figura 10.3 Atividade amilásica de frações colhidas durante a coagulação do látex do fruto de *Carica papaya*. Aliquotas do látex foram coletadas em vários intervalos entre 1 segundo 1.200 segundos e foram dosadas as atividades amilásicas¹⁵. A concentração proteica de cada amostra foi determinada por Bradford¹⁶. Os resultados representam médias de três amostras coletadas, independentemente, com seu desvio padrão.

a evolução normal do processo regenerativo. No modelo de cicatrização em frutos imaturos de lactíferas, a lesão do exocarpo segue um processo de cicatrização mais rápido em Caricaceae (15 a 30 dias) em função do curto intervalo de amadurecimento do fruto *in natura*. É preciso lembrar que, junto com o amadurecimento do fruto, há um notável declínio da atividade proteolítica do látex, condizente com a noção de que não há mais necessidade de proteger o fruto na condição de maturidade. Essa observação abona o conceito de proteção temporária que oferecem as proteinases contra agentes predadores durante a maturação do fruto.

Contudo, existem outros antecedentes que apoiam o papel protetor do látex em Caricaceae. Azarkan et al. (2006)¹² observaram que após consecutivas agressões mecânicas do fruto houve aumento na atividade das enzimas proteolíticas secretadas no látex, sugerindo uma resposta ao estresse induzido pela lesão mecânica. Também, a presença de chitinase em látex de várias espécies, incluindo Caricaceae, sugere a ideia de proteção contra insetos e/ou fungos¹⁷, e um inibidor de serino proteinase da classe Kuniz identificado em látex de Caricaceae pode inibir a atividade proteolítica das enzimas digestivas dos insetos predadores¹⁸. Finalmente, em experimentos em que se aplicaram diretamente as proteinases do látex de Caricaceae em folhas de plantas, houve inibição da atividade predatória das larvas de *Samia ricini*, e que a atividade predatória dependia da presença das enzimas proteolíticas, já que quando eram inibidas perdeu-se a capacidade protetora¹⁰. Em resumo, a evidência apresentada sugere que os componentes do látex em Caricaceae desempenham um papel protetor na planta, já que, ao mesmo tempo que inibem a atividade predatória, interferindo no metabolismo do predador, protegem a planta, criando uma barreira protetora quando da lesão na superfície lesada.

A partir da observação do envolvimento de enzimas proteolíticas cisteínicas na regeneração do tecido vegetal de plantas da família Caricaceae foi proposto o estudo da atividade mitogênica e cicatrizante em frações ricas em proteases do látex de *V. cundinamarcensis* (anteriormente chamada de *Carica candamarcensis*). A purificação dos componentes proteolíticos, obtida por filtração cromatográfica em Sephadex G10, gerou duas frações (P1G10 e P2G10), sendo a primeira delas abundante em cisteíno-proteases¹⁹. Após duas etapas de purificação cromatográfica, em colunas CM-Sephadex e Mono S, foram isoladas duas proteases (CMS2MS2 e CMS2MS3) com atividade mitogênica em fibroblastos e outras linhagens celulares²⁰. A proliferação celular estimulada por CMS2MS2 é mediada pela via das MAP

quinasas, como estabelecido pelo aumento da fosforilação de ERK-2, independentemente de sua atividade proteolítica^{20,21}.

A inédita descoberta de uma proteína mitogênica vegetal com atividade sobre células de mamíferos levou à solicitação de um registro de patente para resguardar as aplicações potenciais da descoberta²⁹.

Conforme as normas das agências regulatórias relacionadas com saúde, o desenvolvimento de um novo medicamento contempla a realização de uma série de etapas. De modo geral, após a identificação da nova molécula ou amostra e da atividade biológica (potencial farmacológico) *in vitro*, a avaliação pré-clínica deve ser realizada. Essa avaliação consiste na aplicação da nova molécula em animais de experimentação definindo os potenciais terapêutico, toxicológico e farmacocinético.

Uma vez estabelecidos esses parâmetros, a seguinte etapa é realizada em seres humanos (ensaios clínicos). Na primeira fase do estudo clínico, denominada de Fase I, são recrutados pequenos grupos de indivíduos hígidos voluntários (entre 20 a 100). Essa pesquisa tem como objetivo estabelecer uma evolução preliminar da segurança e do perfil farmacocinético e, quando possível, um perfil farmacodinâmico da substância. Na sequência, são realizados os ensaios clínicos de Fase II (estudo terapêutico piloto), que visam demonstrar a atividade e estabelecer a segurança em curto prazo do princípio ativo, em pacientes afetados por uma determinada enfermidade ou condição patológica. A pesquisa é realizada em um número, ainda, limitado (entre 100 e 200) de indivíduos e estabelece as relações dose-resposta a fim de obter sólidos antecedentes para a elaboração de estudos terapêuticos ampliados (Fase III).

A fase seguinte (III) consiste em estudos internacionais, de larga escala, em múltiplos centros, com diferentes populações de pacientes para demonstrar eficácia e segurança (população mínima de 800 indivíduos). Exploram-se, nessa fase, o tipo e perfil das reações adversas mais frequentes, assim como características especiais do medicamento e/ou especialidade medicinal, por exemplo: indicação terapêutica, dose e via de administração, interações clinicamente relevantes, principais fatores que possam modificar o efeito, tais como idade, sexo etc.

Nesse momento, o medicamento pode ser comercializado. No entanto, o ensaio clínico é continuado após a comercialização, o que é denominado de Fase IV. Essa fase é também chamada de estudos de farmacovigilância, quando se estabelece o valor terapêutico, o surgimento de novas reações adversas e/ou confirmação da frequência de surgimento das já conhecidas,

e as estratégias de tratamento. Nas pesquisas de Fase IV são seguidas as mesmas normas éticas e científicas aplicadas às pesquisas de fases anteriores.

Com a ideia de desenvolver um medicamento a partir da constatação da atividade mitogênica de proteases do látex de *V. cundinamarcensis*, idealizamos uma sequência de avaliações para os estudos farmacológicos pré-clínicos compreendendo a atividade cicatrizante sobre lesões de pele de origens diversas, assim como a atividade cicatrizante gástrica, sempre utilizando concentrações/doses crescentes do princípio ativo.

A fração P1G10 (0,1%) incorporada em creme Polawax® apresentou efeito cicatrizante sobre escoriações promovidas em camundongos Hairless, com aumento da taxa de cicatrização em até 500% em comparação aos animais controles, sendo também mais eficaz que a própria papaína, a qual promoveu um aumento de 66% na taxa de cicatrização²². A atividade cicatrizante da fração (0,05%), também é evidente em lesões de excisão de pele. Nesse modelo, a oclusão da ferida é acelerada 1,7 vez em comparação com o controle, após cinco dias de tratamento. O aumento da cicatrização é acompanhada de aumento transiente do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor* – VEGF) na região afetada, além de uma melhor resolução de parâmetros inflamatórios (dados não publicados). Em ensaios complementares, a neoformação vascular (angiogênese) induzida pelo princípio foi avaliada através de implantes de polietileno na região subcutânea dorsal de camundongos Swiss que receberam soluções de P1G10 durante oito dias. O conteúdo de hemoglobina presente nos implantes contendo 0,1% P1G10 aumentou 57% em relação ao controle²³.

Em modelo de queimadura, P1G10 (0,1%) incorporada em Polawax®, em camundongos Hairless submetidos à escaldadura da pele, mostrou aumento na velocidade de cicatrização das queimaduras, com período de retração da lesão significativamente menor quando comparado ao controle. A análise microscópica mostrou que o infiltrado inflamatório foi menor, ou até mesmo ausente, nos animais tratados²⁴. Ainda sobre a atividade cicatrizante de P1G10 em lesões cutâneas, em lesões induzidas pela proteína necrótica do veneno de *Loxosceles* (aranha-marrom), vimos que o fechamento da lesão é acelerado quando o P1G10 (0,4%) é administrado localmente (dados do nosso laboratório).

A partir dos relevantes resultados obtidos sobre a cicatrização cutânea, a fração P1G10 foi submetida à avaliação da atividade cicatrizante gástrica em úlceras provocadas pela injeção de ácido acético, que são definidas como úlceras crônicas. A administração oral de P1G10, na dose de 10 mg/Kg, estimulou a cicatrização das lesões de maneira similar ao grupo tratado com

omeprazol 10 mg/Kg (63%) e superior ao apresentado pela ranitidina 100 mg/Kg (52%)²³. Diante desse resultado, passamos à investigação do modo de ação da fração e verificamos que esta é capaz de aumentar em quatro vezes a proliferação celular no bordo das lesões em comparação ao grupo controle. A atividade proteolítica da fração se mostrou importante para o seu efeito cicatrizante, mas não para o efeito mitogênico (dados do nosso laboratório).

Pelo que se pode entender, não só o processo de cicatrização foi estimulado pela fração, mas também a manutenção do equilíbrio de produção ou liberação de agentes endógenos protetores e agressores da mucosa gástrica. Em modelos de lesões agudas, verificamos que o tratamento oral com a fração na dose de 10 mg/Kg protege o estômago de lesões promovidas por etanol, indometacina, estresse e ligação pilórica, reduzindo entre 40% e 88% o número e a gravidade de tais lesões. Nessa mesma dose, verificou-se que a fração reduz a quantidade de ácido e pepsina presentes no suco gástrico e aumenta os níveis de muco e grupos sulfidrilas na mucosa, o que pode explicar sua ação gastroprotetora²³.

10.4 PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS

Em estudos de toxicidade tópica, verificou-se que a exposição repetida à fração proteica P1G10 (0,1 e 1,0%), por 15 dias, em pele íntegra e escarificada de camundongos Hairless não promoveu qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como efeito tóxico (irritação e/ou corrosão). Já a concentração de 10% apresentou um potencial irritante moderado; no entanto, essa irritação foi revertida após cinco dias da última aplicação²².

Na avaliação da toxicidade tópica subcrônica/crônica, a fração foi administrada durante três e seis meses, na concentração de 0,1% (maior efeito cicatrizante) em camundongos Swiss, previamente depilados. Os resultados da análise histopatológica e da variação de peso dos órgãos selecionados mostraram que não houve diferenças entre o grupo controle (Polawax®) e o tratado com P1G10, indicando uma ausência de toxicidade no modelo estudado²⁴.

A toxicidade sistêmica aguda de P1G10 foi avaliada, determinando-se as doses não letais da fração como sendo abaixo de 5 mg/Kg para as vias intraperitoneais (*i.p.*) e intravenosa (*i.v.*) e abaixo de 300 mg/Kg para administração oral (*v.o.*). Esses resultados demonstram a baixa toxicidade de P1G10 por via sistêmica, permitindo a execução de estudos pré-clínicos e clínicos com segurança. Corroborando esses resultados, as atividades de enzimas do

citocromo P450, o consumo alimentar, o ganho de peso corporal, o peso do fígado e os valores de proteínas totais microsossomais não foram alterados pela administração oral de P1G10, em doses até 30 vezes maiores (334 mg/Kg/dia durante 6 dias consecutivos, totalizando, nesse período, 2 g/Kg por *v.o.*) que a descrita com atividade antiúlcera gástrica (10 mg/Kg)²⁵.

A avaliação da atividade genotóxica foi realizada pelo teste de Ames²⁶ e dos micronúcleos²⁷. O primeiro foi realizado com um painel de cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 97, 98, 100 e 102), na presença e ausência de extrato S9 (extrato hepático de ratos tratados com fenobarbital). Os resultados mostraram que P1G10 não apresenta efeito mutagênico nas concentrações estudadas, uma vez que o número de colônias que sofreram reversão pelo tratamento com a fração nas concentrações de 0,1 e 1,0% p/v foi semelhante ao número de reversões espontâneas (controle negativo) e 10 vezes menores que o obtido após a exposição à azida sódica (controle positivo). No teste de Micronúcleos, P1G10 foi administrada via *i.p.* em camundongos Swiss, nas doses de 5 e 10 mg/Kg. A avaliação de células de medula óssea desses animais, após 36 horas da administração, mostrou que P1G10 não provocou micronucleação significativamente maior que o controle, sugerindo a ausência de genotoxicidade da fração²⁸.

10.5 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

Utilizando P1G10 marcada com o isótopo radioativo ^{99m}Tc em camundongos Swiss pudemos observar que, por *e.v.*, as maiores taxas relativas (área sob a curva, do inglês *area under the curve* – AUC, $AUC_{\text{órgão}} / AUC_{\text{sangue}} = Kp$) foram encontradas na bexiga (113,7), rins (46,1), intestino grosso (5,5), fígado (4,2) e intestino delgado (1,2), enquanto pele (0,72), coração (0,68), tireoide (0,48), tecido adiposo (0,30) e cérebro (0,06) apresentaram as menores taxas. Em outras palavras, as maiores taxas de captação foram observadas nos órgãos relacionados à metabolização e excreção de fármacos. Já para a via *v.o.*, as maiores taxas de *Kp* foram encontradas nos órgãos do trato gastrointestinal, corroborando com o pequeno valor de biodisponibilidade por essa via (8,3%) (dados do nosso laboratório).

Em vista do potencial efeito cicatrizante cutâneo e da segurança determinadas em modelos de experimentação animal, avançamos no processo de desenvolvimento de um medicamento e iniciamos a realização de ensaios clínicos.

10.6 ESTUDO CLÍNICO DE FASE I

Dada a possível utilização da fração P1G10 como cicatrizante cutâneo, ela foi administrada na concentração de 0,1% no antebraço de voluntários hígidos por 30 dias, três vezes por semana. Dos 25 indivíduos participantes da avaliação, nenhum desenvolveu reações evidenciadas por eritema, edema, calor, dermatite, prurido ou dor no local da aplicação do veículo ou da amostra 0,1% P1G10. Exames laboratoriais (hemograma, análises bioquímicas no sangue e urina) foram realizados antes e após as aplicações do produto. Nas duas situações, obtivemos diferenças significativas de alguns valores do hemograma e dosagens séricas bioquímicas, com e sem aplicação do produto, porém, esses valores estavam compreendidos no intervalo de normalidade, ou seja, sem relevância clínica. Assim, a partir da constatação da inocuidade da fração P1G10, demos os primeiros passos na avaliação da eficácia e segurança do uso de P1G10 como cicatrizante cutâneo em humanos: a Fase Clínica II.

10.7 ENSAIO CLÍNICO FASE II

Nesta fase, um estudo piloto foi realizado na cidade de Ciego de Ávila, Cuba, cujo protocolo de ensaio clínico Fase II foi aprovado pelo Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos (CENCEC), Havana, Cuba. Esse estudo foi randomizado, controlado e duplo-cego, consistindo em tratar úlceras por pressão e venosas. A população foi composta por indivíduos adultos (de idade igual ou superior a 18 anos), de ambos os sexos, residentes na cidade de Ciego de Ávila, capital da província de Ciego de Ávila, em Cuba.

Das 210 famílias cadastradas e atendidas pelo Centro Policlínico, dez indivíduos atendiam os critérios de inclusão, de modo que a amostra foi dividida em quatro grupos, sendo dois de cada um, por alocação aleatória, de acordo com as opções de tratamento: a) aplicação de creme contendo 1,0% sulfadiazina de prata e b) aplicação de creme contendo a fração 0,1% P1G10. Os esquemas de tratamento foram semelhantes para os quatro grupos, aplicando-se o creme três vezes por semana, até a confirmação visual da existência de tecido de granulação em 100,0% da lesão, ou sua epitelização completa, ou que completassem as seis semanas de tratamento.

Nessa fase, também não foram encontradas evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade da fração P1G10 0,1% em úlceras por pressão ou

venosas, considerando a limitação do tamanho amostral. As feridas tratadas com a fração P1G10 0,1% apresentaram, em média, diminuição dos valores de comprimento (51,0%), largura (67,0%) e profundidade (37,0%), enquanto apenas os valores de profundidade das feridas tratadas com 1,0% sulfadiazina de prata diminuíram (74,0%) e os de comprimento e largura aumentaram; entretanto, o reduzido tamanho da amostra não permitiu elaborar conclusões a partir desses resultados.

O recrutamento de indivíduos que possam fazer parte de um ensaio clínico é tarefa difícil, como pode ser visto na literatura e no exemplo acima, considerando os critérios de inclusão/exclusão. Desse modo, no momento estamos realizando um ensaio de Fase II mostrando o efeito de P1G10 em feridas de indivíduos diabéticos, considerando que, dada a dificuldade de cicatrização dessas feridas, o produto possa ser uma indicação terapêutica.

Simultaneamente aos ensaios clínicos de Fase II, vem sendo desenvolvida a aplicação terapêutica em pessoas com lesões crônicas de difícil cicatrização. Assim, um número significativo de indivíduos se tem beneficiado com o tratamento, utilizando o sistema de receita magistral emitido por profissional da saúde. A Figura 10.4 mostra a evolução de uma lesão profunda infeccionada que, após um período de três meses de tratamento com a fração proteolítica, atingiu a epitelização completa. Deve-se ressaltar que, anteriormente, o paciente foi submetido a técnicas e tratamento preconizados para a cicatrização da lesão (limpeza, desbridamento e aplicação de antibióticos) por mais de seis meses, sem sucesso.



Figura 10.4 Estado inicial e final de úlcera submetida a tratamento com P1G10. Uma formulação de aplicação tópica contendo P1G10 foi aplicada três vezes por semana durante um período de 100 dias. O leito da ferida foi limpo com soro fisiológico antes da aplicação da formulação.

10.8 CONCLUSÃO

É possível concluir que componentes do látex da Caricaceae *V. cundinamarcensis* apresentam ação cicatrizante heteróloga, quando aplicados na pele de mamíferos. Nos modelos animais estudados, essas cisteíno-proteinases foram eficazes como cicatrizante em lesões cutâneas de diferentes etiologias. É provável que a ação cicatrizante esteja relacionada com a capacidade mitogênica, mostrada para algumas das enzimas presentes no látex. Aliado ao exposto, essas proteinases apresentam baixa toxicidade tópica em humanos, assim como possuem relevantes características terapêuticas para serem utilizadas na clínica.

REFERÊNCIAS

1. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* 1993;290(Pt 1):205-18.
2. Richardson M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry.* 1977;(16)159-69.
3. Grudkowska M, Zagdanska B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol.* 2004;51:609-24.
4. Konno K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry.* 2011;72:1510-30.
5. Parijs JV, Broekaert WF, Goldstein IJ, Peumans WJ. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta.* 1991;183:258-64.
6. Backhaus RA. Rubber formation in plants; a mini-review. *Israel Journal of Botany.* 1985;34:283-93.
7. Cornish K. The roles of cis and trans prenyl transferases in polyisoprene biosynthesis. *European Journal of Biochemistry.* 1993;218:267-71.
8. Gomes MT, Oliva ML, Lopes MT, Salas CE. Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. *Curr Protein Pept Sci.* 2011;12:417-36.
9. Wiśniewski K, Zagdańska B. Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J Exp Bot.* 2001;52:1455-63.
10. Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* 2004;37:370-8.
11. Van der Hoorn RAL, Jones JDG. The plant proteolytic machinery and its role in defense. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7:400-7.
12. Azarkan M, Dibiani R, Baulard C, Baeyens-Volant D. Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity. *Internat J of Biol Macromolecules.* 2006;38:216-24.
13. Dussourd DE, Denno RF. Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. *Ecology.* 1991;72:1383-96.
14. Dussourd DE. Behavioral sabotage of plant defense: Do vein cuts and trenches reduce insect exposure to exudate? *Journal of Insect Behavior.* 1999;12:501-15.
15. Moutim V, Silva LG, Lopes MTP, Wilson Fernandes G, Salas CE. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Sci.* 1999;142:115-21.
16. Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

17. Graham LS, Sticklen MB. Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany*. 1994;72: 1057-83.
18. El Moussaoui A, Nijs M, Paul C, Wintjens R, Vincentelli J, Azarkan M, Looze Y. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:556-70.
19. Silva CA, Gomes MTR, Lopes MTP, Mello VJ, Ferreira RS, Rodrigues KCL, Salas CE. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Planta Medica* (Stuttgart). 2003;69:926-32.
20. Gomes MTR, Mello VJ, Rodrigues KCL, Bemquerer M, Lopes MTP, Faça VM, Salas CE. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. *Planta Medica* (Stuttgart). 2005;71:244-8.
21. Gomes MTR, Teixeira RD, Ribeiro H, Turchetti AP, Junqueira C, Lopes MTP, Nagem RAP, Salas CE. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of CMS1MS2. *Acta Crystallographica Series F*. 2008;1:1-5.
22. Mello VJ, Gomes MTR, Lopes MTP, Rodrigues KCL, Sanchez EF, Salas CE. Plant proteinases: Their potential as therapeutic drugs In: *Recent progress in medicinal Plants: Development from new molecules* ed. Houston: Studium Press LLC; 2005. v.11, p. 213-224.
23. Mello VJ, Gomes MTR, Lemos FO, Delfino JL, Andrade SP, Lopes MTP, Salas CE. Plant proteinases: the gastric protective and healing role of cysteine proteinases from Caricaceae. *Phytomedicine* (Stuttgart). 2008;15:237-44.
24. Lemos FO, Ferreira LA, Cardoso VN, Cassali G, Salas CE, Lopes MTP. Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. *European Journal of Dermatology*. 2011;21:722-30
25. Salas CE, Villalba MI, Mello V, Bilheiro R, Cassali G, Tagliati C, Martínez-Larrañaga M, Anadon A, Lopes MTP. Oral subchronic toxicity evaluation of a latex proteolytic fraction from *Carica candamarcensis*. *Toxicol Lett*. 2010;196:S258.
26. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983;113:173-215.
27. Fenech M. Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res*. 1985;148:29-36.
28. Villalba M, Silva AC, Tagliati C, Cassali G, Salas CE, Lopes MTP. Acute systemic toxicological and mutagenic evaluations of a proteolytic fraction from latex of *Carica candamarcensis*. *Toxicol Lett*. 2010;196:S167.
29. Salas C, Lopes M, Schidermann A, inventors. Proteases from *Carica* having mitogenic activity and their methods of use. United States patent. US20060153830A1; 2006 Mar 17.

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA

PEPTIDASES EM BIOTECNOLOGIA: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E MERCADO

Anderson Fragoso dos Santos
Rafael Messias Gandra
Simone Santiago Carvalho de Oliveira
Lucimar Ferreira Kneipp
Claudia Masini d'Avila-Levy
Cátia Lacerda Sodré
Marta Helena Branquinha
André Luis Souza dos Santos

11.1 INTRODUÇÃO

As enzimas são de fundamental importância à existência da vida sob diferentes aspectos, uma vez que desempenham funções centrais em processos metabólicos essenciais à manutenção da homeostase e dinâmica celular¹. As enzimas (do grego *en*, dentro, e *zyme*, fermento) são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas e aceleram a velocidade de uma reação química. As enzimas têm valor comercial, pois apresentam múltiplas aplicações em diversos setores industriais, como nas indústrias de detergentes, alimentos, têxteis, farmacêuticas, cosméticos, diagnósticos e química fina²⁻⁷. O uso

de enzimas em processos industriais, em detrimento aos métodos químicos convencionais, vem sendo proposto com veemência devido ao fato de os processos enzimáticos não serem tóxicos, o que minimiza o impacto ambiental. A aplicação de enzimas apresenta também como vantagens: a economia de água, energia, produtos químicos e redução do custo no tratamento de efluentes²⁻⁷.

As peptidases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas utilizadas em diferentes processos industriais (Tabela 11.1). Correspondem a aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas industriais, a saber: peptidases alcalinas (25%), tripsinas (3%), reninas (10%) e outras peptidases (21%)²⁻⁷. As principais companhias produtoras de peptidases no mundo estão listadas na Tabela 11.2.

Tabela 11.1 Aplicações de peptidases em processos industriais

| INDÚSTRIA | PEPTIDASE | APLICAÇÃO |
|----------------------------|---|--|
| Panificação | Peptidase neutra | Condicionador de massa |
| Produção de bebidas | Papaína | Remoção da turvação em bebidas |
| Indústria de laticínios | Peptidases fúngicas, quimosina, outras peptidases | Substituição do uso da renina de bezerras, processamento das proteínas do soro do leite, produção de enzima modificadora do queijo |
| Indústria de detergentes | Peptidase alcalina, subtilisina | Detergentes usados em máquinas de lavar roupa para remoção de manchas |
| Processamento de alimentos | Várias peptidases | Modificação de materiais ricos em proteína, como proteínas da soja ou glúten |
| Indústria do couro | Tripsina, outras peptidases | Amaciamento do couro, remoção de pelos |
| Indústria de carne e peixe | Papaína, outras peptidases | Amaciamento da carne, recuperação de proteínas de ossos e restos de peixe |
| Medicina | Tripsina | Remoção de tecidos necrosados, agente fibrinolítico |
| Indústria fotográfica | Várias peptidases | Recuperação da prata usada em filmes fotográficos e de raios X |
| Produção de adoçantes | Termolisina | Hidrólise reversa durante a síntese do aspartame |

Fonte: Adaptado de Kumar e Takagi (1999)², Rao et al. (2013)⁴ e Ray (2012)⁶.

Tabela 11.2 Principais indústrias produtoras de peptidases

| COMPANHIA | PAÍS | PARTICIPAÇÃO DE MERCADO |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Novozymes e Novo Nordisk | Dinamarca | 40% |
| Gist-Brocades | Holanda | 20% |
| Genencor International | Estados Unidos da América | 10% |
| Miles Laboratories | Estados Unidos da América | 10% |
| Advance Biochemicals | Índia | 20% |
| Amano Pharmaceuticals | Japão | |
| DSM | Holanda | |
| EKR Therapeutics | Estados Unidos da América | |
| Enzyme Development | Estados Unidos da América | |
| Genentech | Estados Unidos da América | |
| Godo Shusei | Japão | |
| Henkel | Alemanha | |
| Kao Corporation | Japão | |
| Nagase Biochemicals | Japão | |
| Rohm | Alemanha | |
| Solvay Enzymes GmbH | Alemanha | |
| Wuxi Synder Bioproducts | China | |

Fonte: Adaptado de Kumar e Takagi (1999)², Rao et al. (2013)⁴, Ray (2012)⁶ e Gupta et al., 2002.

Os micro-organismos são responsáveis por uma parcela considerável, cerca de dois terços, da produção de peptidases comerciais em todo o mundo^{2,7,8}. As peptidases microbianas são classificadas em vários grupos, dependendo de suas características físico-químicas: por exemplo, atividade ótima em condições ácidas, neutras ou alcalinas de pH, assim como as características do grupamento químico presente no centro ativo da enzima. Nesse contexto, as peptidases alcalinas secretadas por micro-organismos têm destaque em diferentes processos industriais. Diferentes empresas de todo o mundo lançaram com sucesso vários produtos contendo em suas formulações peptidases alcalinas, como detergentes e produtos de limpeza para membranas filtrantes e materiais cirúrgicos^{2,7,8}. As peptidases microbianas para uso industrial são produzidas, principalmente, por diferentes espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* e também por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*⁹. Embora existam muitas fontes microbianas disponíveis para a produção de peptidases, apenas alguns poucos

micro-organismos são reconhecidos como produtores comerciais. A Tabela 11.3 sumariza algumas espécies microbianas produtoras de peptidases alcalinas de interesse biotecnológico.

Tabela 11.3 Principais micro-organismos produtores de peptidases alcalinas de interesse industrial

| GÊNEROS | ESPÉCIES |
|--------------------|---|
| <i>Bacillus</i> | <i>B. alcalophilus</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. intermedius</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. proteolyticus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i> e diferentes cepas de <i>Bacillus</i> sp. |
| <i>Aspergillus</i> | <i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. mellius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. sojae</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. sydowi</i> e diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> sp. |
| Outros | <i>Clostridium</i> sp., <i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Mucor michei</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Serratia</i> sp. |

Fonte: Adaptado de Kumar e Takagi (1999)² e Jisha et al. (2013)⁸.

11.2 CLASSIFICAÇÃO DAS PEPTIDASES

Os termos encontrados na literatura para se referir às enzimas hidrolíticas capazes de clivar ligações peptídicas são peptidases, peptídeo-hidrolases, proteases, proteinases ou enzimas proteolíticas. Apesar de esses termos serem usados comumente como sinônimos, o termo que melhor representa toda abrangência desta classe enzimática é peptidases. O termo proteinase, por exemplo, refere-se a uma subdivisão das peptidases, as endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas da molécula de proteína, e não as porções amino ou carboxiterminal, que são denominadas exopeptidases (Figura 11.1). Dessa forma, o termo proteinase surge pela inserção da partícula “*in*”, que na língua inglesa significa dentro, para designar a clivagem “dentro” da molécula de proteína. Já os termos proteases ou enzimas proteolíticas, por suas naturezas etimológicas, excluem aquelas enzimas que clivam ligações peptídicas em peptídeos, além de não refletirem a natureza da hidrólise realizada, que se dá sobre a ligação peptídica. Por essas razões, o termo peptidases é o empregado e recomendado pelos comitês de nomenclatura em bioquímica* e pelo banco de dados MEROPS**^{10,11}.

* Ver <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>.

** Ver <http://merops.sanger.ac.uk/>.

Os comitês de nomenclatura enzimática formam a Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), composta pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). As peptidases pertencem à classe enzimática (do inglês, *enzyme class* – EC) 3 (hidrolases), subclasse 3.4 (peptidases). Essas enzimas são ainda subdivididas em exopeptidases (EC 3.4.11 a 3.4.19) e endopeptidases (EC 3.4.21 a 3.4.25); aquelas com mecanismo catalítico desconhecido são agrupadas temporariamente sob a classe EC 3.4.99 (Figura 11.1). Esses dois subgrupos, endopeptidases e exopeptidases, possuem ainda subclassificações quanto ao aminoácido liberado na catálise e natureza do sítio catalítico. Enzimas hidrolíticas costumam ser classificadas e denominadas em função da natureza de seus respectivos substratos; entretanto, para peptidases essa abordagem não é eficiente. Embora essas enzimas basicamente clivem ligações peptídicas, existem diferenças quanto à posição da ligação hidrolisada na cadeia peptídica e a sequência de aminoácidos de preferência nos dois lados dessa ligação (...-P'3-P'2-P'1—P1-P2-P3-...) (Figura 11.1). Se tais diferenças fossem consideradas, seria praticamente impossível construir um sistema geral de classificação e nomenclatura das peptidases. Devido a isso, o sistema de classificação empregado se baseia no tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relações evolutivas baseadas na sequência de aminoácidos e estrutura terciária da peptidase. Com base na natureza química do sítio catalítico, as carboxipeptidases, que clivam ligações peptídicas na porção carboxiterminal de substratos proteicos, são subdivididas em serina (EC 3.4.16), metalo (EC 3.4.17) e cisteína-peptidases (EC 3.4.18). As endopeptidases são subdivididas em serina (EC 3.4.21.), cisteína (EC 3.4.22), aspártico (EC 3.4.23), metalo (EC 3.4.24) e treonina-peptidases (EC 3.4.25) (Figura 11.1). Os nomes derivam do aminoácido crítico para a catálise, ao passo que as metalopeptidases dependem de um ou dois íons metálicos para essa função. Existe, atualmente, um sexto tipo catalítico, as glutâmico-peptidases, que apresentam o ácido glutâmico em seu sítio ativo. Este método de classificação, com base na natureza química do sítio catalítico, foi implementado com sucesso e foi um dos melhores sistemas de classificação desenvolvidos até o presente momento. Entretanto, com a disponibilização de diversos genomas completos, ficou evidente a complexidade da classificação e análise dessa classe enzimática. Por exemplo, há dez anos, dos 90 genomas sequenciados, as peptidases e seus homólogos correspondiam a 3% do total de produtos gênicos em todos os organismos⁹. Entretanto, nas últimas duas décadas, a velocidade

de alimentação dos bancos de dados com novas sequências tem crescido de forma logarítmica¹².

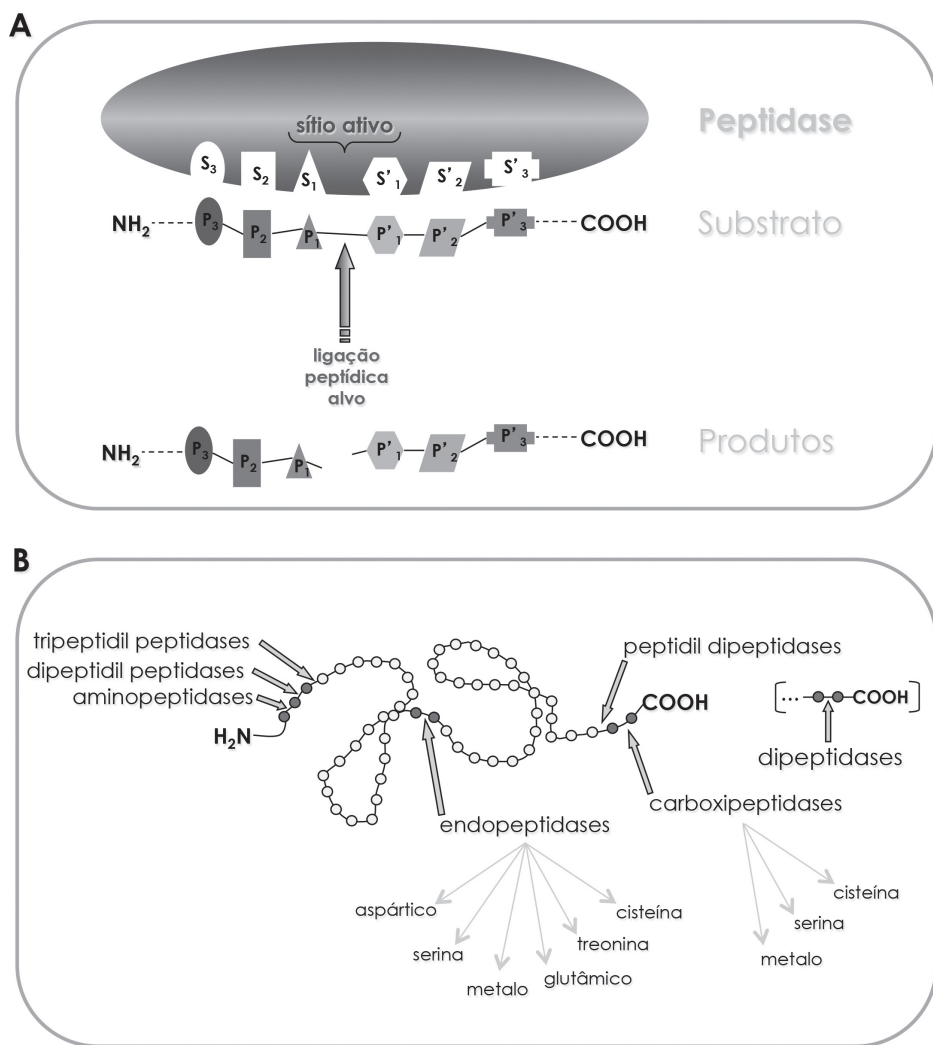


Figura 11.1 (A) Representação esquemática da região de ligação e do sítio catalítico (sítio ativo) de uma peptidase. Esta peptidase hipotética possui seis subsítios (S1, S2, S3 e S'1, S'2, S'3) em seu sítio catalítico e, consequentemente, é capaz de reconhecer e ligar-se a uma sequência de seis aminoácidos (P1, P2, P3 e P'1, P'2, P'3) no substrato proteico. Após a proteólise, pelo menos dois peptídeos menores são gerados como produtos de reação. (B) Classificação das peptidases. Círculos cinza-claros representam os aminoácidos e os círculos cinza-escuros indicam a sequência de aminoácidos que se ligará à peptidase. As setas grossas apontam para o local de clivagem no substrato proteico. As setas finas indicam a subclassificação de carboxipeptidases e endopeptidases de acordo com o grupamento químico presente no sítio catalítico da enzima.

O banco de dados MEROPS apresenta um sistema de classificação e nomenclatura para as peptidases e seus inibidores que acompanha a velocidade de geração de informação da era conhecida como “pós-genômica”. Esse sistema agrupa as enzimas em famílias de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos. As famílias de mesma ancestralidade são, por sua vez, agrupadas em clãs, sendo esse tipo de informação determinada pela estrutura terciária das peptidases¹². Esse banco de dados tem sido amplamente usado pela comunidade científica devido à sua abrangência, completude, integração de informações e interface de uso amigável (“*user friendly*”). Nesse banco de dados, estão reunidas e organizadas uma série de informações críticas para quem deseja aprofundar o conhecimento em peptidases, sendo facilmente acessadas informações como: identificador da sequência no MEROPS; nome científico do organismo no qual foi realizada a caracterização; tamanho da sequência; assinalamento do domínio responsável pela atividade peptidásica; identificação da tríade catalítica presumida (e íons metálicos para as metalo-peptidases); *link* para o número de acesso em outros bancos de dados; sítios de clivagem conhecidos em substratos; lista de substratos degradados; inibidores conhecidos; homologia com peptidases “tipo” (aquelas bem caracterizadas); nome do gene incluindo índice de sinônimos conhecidos e locus em caso de genomas completos; *link* para referência bibliográfica (atualmente existem mais de 44 mil referências indexadas nesse banco de dados); e visualização da estrutura terciária quando disponível¹². As famílias são representadas por uma letra, que indica o mecanismo catalítico e um número característico de cada enzima. O clã é representado por duas letras: a primeira indica o tipo de mecanismo catalítico e a segunda é adicionada sequencialmente. As letras usadas são “A” (aspartico-peptidases), “C” (cisteína-peptidases), “G” (glutâmico-peptidases), “M” (metalo-peptidases), “S” (serina-peptidases), “T” (treonina-peptidases) ou “U” (tipo desconhecido, do inglês, *unknown*)¹⁰⁻¹².

11.3 INIBIDORES DE PEPTIDASES

Inibidores de peptidases são ferramentas importantes para estudos funcionais e bioquímicos dessa classe de enzimas. O banco de dados MEROPS cataloga informações referente aos inibidores de peptidases, que podem ser classificados em proteicos ou pequenas moléculas. Os inibidores de origem proteica são classificados em famílias e clãs com base na sequência de aminoácidos e estrutura terciária, de forma similar ao que ocorre no próprio

MEROPS com as peptidases. No entanto, os inibidores de peptidases referentes a moléculas pequenas não se encaixam em nenhum tipo de classificação, em função da ampla variedade de estruturas químicas, e, portanto, recebem a letra “J” seguida da numeração que identifica cada composto¹². Os inibidores de peptidases podem reagir com mais de uma classe de peptidase, uma única classe, ou reagir com uma única peptidase. No banco de dados MEROPS, diversas informações úteis de cada inibidor foram organizadas, tais como: nome e sinônimos, estrutura química, peptidases inibidas, mecanismo de inibição, referências bibliográficas, histórico, comentários em geral (incluindo a solubilidade em água ou solventes orgânicos) e classe do inibidor¹².

A inibição seletiva de peptidases é uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de infecções virais e parasitárias; câncer; condições inflamatórias, imunológicas e respiratórias; e distúrbios cardiovasculares e degenerativas, incluindo a doença de Alzheimer. Entretanto, frente a esse enorme potencial, o número de moléculas aprovadas para uso clínico ainda é baixo^{13,14}. Atualmente, entre as classes de peptidases com aplicação para desenvolvimento de fármacos estão as serina, metalo, cisteína, aspártico e treonina-peptidases. A inibição de serina-peptidases tem sido alvo no combate a doenças inflamatórias como asma e artrite reumatoide, além da atuação sobre a cascata de coagulação sanguínea. Já existem compostos com uso clínico aprovado para o tratamento da trombose e doenças inflamatórias (Tabela 11.4). Até o presente momento, não há fármacos disponíveis no mercado para inibição da classe das cisteína-peptidases. No entanto, diversos estudos apontam para o desenvolvimento de drogas contra as cisteína-peptidases, reconhecidas como fatores de virulência, produzidas por protozoários como *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*, os causadores de doenças negligenciadas como leishmaniose, doença de Chagas e malária, respectivamente¹⁵. Em relação à classe das metalo-peptidases, existem produtos com uso clínico aprovado e que são amplamente utilizados no tratamento de hipertensão e periodontite¹³. Por fim, a inibição da classe das aspártico-peptidases representa um dos primeiros exemplos bem-sucedidos do desenvolvimento de inibidores de peptidases baseados em estudos de modelagem molecular. A partir da descrição da estrutura tridimensional da peptidase do vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus* – HIV), agente etiológico da síndrome de imunodeficiência adquirida (*acquired immune deficiency syndrome* – AIDS), os inibidores foram desenhados para se ligarem especificamente ao sítio ativo da enzima viral. Atualmente, existem dez inibidores da aspártico peptidase do HIV com amplo uso

na clínica médica (Tabela 11.4)^{16,17}. Existe ainda uma série de compostos inibidores da β -secretase (do inglês *beta-amyloid-converting enzyme* – BACE) para o tratamento da doença de Alzheimer, que estão em diferentes fases de testes clínicos (exemplo: MK-8931, desenvolvido pela empresa farmacêutica Merck, que iniciou os testes clínicos de fase II/III em dezembro de 2012*), bem como inibidores de renina para o tratamento da hipertensão**.

Tabela 11.4 Lista de inibidores de peptidases utilizados na clínica médica

| CLASSE DE PEPTIDASE | ENZIMA-ALVO | INDICAÇÃO | NOME DO FÁRMACO | FABRICANTE |
|---------------------|---|--|--|--------------------------------------|
| Serina | Trombina | Trombose venosa | Ximelagatran | Astra Zeneca |
| Serina | Trombina | Trombose arterial | Argatroban | Mitsubishi Pharma |
| Serina | Elastase | Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), inflamação | Sivelastat, Elastopol | Ono |
| Serina | Ampla espectro | Pancreatite, inflamação | Nafamostat, FUT175 | Japan Tobacco |
| Serina | Ampla espectro | Pancreatite | Camostat mesilate | Ono |
| Treonina | Proteassoma | Câncer (mieloma) | Bortezomib | Millenium |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Ritonavir | Abbott Laboratories |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Lopinavir | Abbott Laboratories |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Nelfinavir | Pfizer |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Atazanavir | Bristol-Myers Squibb Company |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Amprenavir | GlaxoSmithKline |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Saquinavir | Hoffmann-La Roche |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Indinavir | Merck & Co. |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Fosamprenavir | GlaxoSmith Kline |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Tipranavir | Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals |
| Aspártico | HIV-1 peptidase | HIV/AIDS | Darunavir | Tibotec Pharmaceuticals |
| Metalo | ACE (enzima conversora de angiotensina) | Hipertensão | Trandolapril, Enalapril, Captopril e vários outros | Vários |
| Metalo | MMP-1 (metalo-peptidase de matriz 1) | Periodontite | Doxycycline | CollaGenex |

* Ver <http://www.mercknewsroom.com/press-release/research-and-development-news/merck-initiates-phase-iii-study-investigational-bace-i>.

** Ver <http://www.actelion.com>.

| CLASSE DE PEPTIDASE | ENZIMA-ALVO | INDICAÇÃO | NOME DO FÁRMACO | FABRICANTE |
|---------------------|--------------------------------------|----------------------|-----------------|------------|
| Metalo | MMP-2 (metalo-peptidase de matriz 2) | Doenças periodontais | Periostat | Vários |
| Metalo | MMP-8 (metalo-peptidase de matriz 8) | Osteoartrite | Glucosamine | Rottapharm |

Fontes: Adaptado de Dash et al. (2003)¹⁶ e Santos e Braga-Silva (2013)¹⁷.

11.4 MERCADO, APLICAÇÃO E PRODUÇÃO DE PEPTIDASES: VISÃO GLOBAL

O principal objetivo desta seção é apresentar uma análise abrangente e atual do mercado, aplicação e produção de peptidases, bem como uma projeção futura no mercado mundial de enzimas.

Dentre as enzimas empregadas para fins industriais, 75% pertencem à classe das hidrolases e, nesse universo, as peptidases representam aproximadamente 60%⁴. Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated* denominado *World Enzyme*, o mercado mundial de peptidases foi avaliado em 975 milhões de dólares em 2000, 1,2 bilhões de dólares em 2005 e 1,6 bilhões de dólares em 2010. O mercado estimado para 2015 é de cerca de 2,2 bilhões de dólares, com uma projeção de crescimento anual de aproximadamente 6%, chegando a aproximadamente 2,8 bilhões de dólares até o ano de 2020 (Tabela 11.5).¹⁸⁻²⁰ O mercado de peptidases está dividido em peptidases industriais (usadas em produtos de limpeza, alimentos e bebidas, entre outras aplicações) e peptidases especiais (usadas em produtos farmacêuticos, por exemplo). Em 2010, as peptidases de uso industrial representaram cerca de 67% da demanda mundial de peptidases, chegando à vultosa quantia de aproximadamente 1,12 bilhões de dólares.¹⁸⁻²⁰

A demanda mundial por enzimas foi avaliada em 5,7 bilhões de dólares em 2010, e o mercado de peptidases correspondeu a cerca de 29% deste montante (Tabela 11.5). As peptidases executam uma ampla variedade de funções nos mais diversos setores industriais, com importantes aplicações na formulação de detergentes, na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil,

* Ver <http://www.freedoniagroup.com/>.

de cosméticos e de produtos de higiene pessoal, bem como em rações para animais, papel e celulose, pesquisa, biotecnologia e processos de biorremediação^{2,5,7,18-22}. A utilização de peptidases em um conjunto diversificado de aplicações significa que uma grande variedade de empresas oferecem essas enzimas. Enquanto muitas empresas, como Genentech e EKR Therapeutics, restringem suas ofertas a mercados específicos, a Novozymes e Novo Nordisk, líderes mundiais no mercado de enzimas, oferecem peptidases para quase todas as aplicações industriais^{*}.¹⁸⁻²⁰

Tabela 11.5 Demanda mundial de peptidases

| ANO | 2000 | 2005 | 2010 | 2015 | 2020 |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Produto interno bruto mundial (bilhões de US\$) | 53.660 | 63.890 | 75.350 | 92.800 | 113.800 |
| US\$ peptidases/milhões de US\$ PIB | 18 | 20 | 22 | 24 | 25 |
| Demanda mundial de peptidases (milhões de US\$) | 975 | 1.260 | 1.675 | 2.200 | 2.850 |
| Industrial: | 715 | 852 | 1.120 | 1.479 | 1.951 |
| Produtos de limpeza | 415 | 480 | 600 | 760 | 940 |
| Alimentos e bebidas | 222 | 285 | 415 | 585 | 825 |
| Outros produtos industriais | 78 | 87 | 105 | 134 | 186 |
| Especial: | 260 | 408 | 555 | 721 | 899 |
| Produtos farmacêuticos | 215 | 352 | 485 | 625 | 760 |
| Outros produtos especiais | 45 | 56 | 70 | 96 | 139 |
| Demanda mundial de enzimas (milhões de US\$) | 2.625 | 3.830 | 5.750 | 7.980 | 11.250 |
| % peptidases | 37,1 | 32,9 | 29,1 | 27,6 | 25,3 |

Fonte: Adaptado de Freedonia Group Incorporated.¹⁸⁻²⁰

O mercado com maior projeção de crescimento na demanda por peptidases para os próximos anos é o de alimentos e bebidas. A estimativa de aumento é de aproximadamente 99% até 2020, chegando a 585 milhões de

* Ver [<http://www.freedoniagroup.com/>]

dólares e 825 milhões de dólares em 2015 e 2020, respectivamente (Tabela 11.5).¹⁸⁻²⁰ O crescimento vertiginoso de produção de peptidases nesses dois setores compensará os avanços mais modestos na maioria dos outros mercados. Nesse setor, as peptidases têm aplicação cada vez maior na melhoria de alimentos proteicos em relação ao seu sabor, aroma, textura, funcionalidade e a sua qualidade nutricional. As proteínas modificadas enzimaticamente podem também substituir gorduras e glicídios, fornecendo ao alimento a textura e a qualidade desejadas. Na indústria de queijos, por exemplo, as peptidases atuam no sentido de prevenir a coagulação do leite durante a produção, hidrolisando proteínas específicas chamadas caseínas⁵. Na indústria de carne, uma peptidase denominada papaína foi utilizada pela primeira vez como amaciante. A papaína foi extraída originalmente de folhas e frutos verdes da planta *Carica papaya*; porém, atualmente são mais usuais as de origem microbiana. Peptidases são também usadas na produção de extrato de carne, ingrediente muito comum no preparo de sopas e molhos²³, e têm papel importante nas formulações de alimentos infantis e de produtos dietéticos específicos^{24,25}. Além disso, as peptidases têm sido cada vez mais utilizadas para reduzir a viscosidade na fabricação de cerveja e para auxiliar na limpeza de membranas filtrantes usadas em processamento de suco de frutas, tendo também relevante papel na fortificação dessas bebidas, atuando na preparação de hidrolisados proteicos com elevados valores nutritivos. Dentre todas as aplicações citadas no setor de alimentos e bebidas, o uso na coagulação para fabricação de queijos constitui a maior utilização.

A aplicação de peptidases na indústria farmacêutica tem uma projeção de crescimento de 57% até 2020, chegando a 625 milhões de dólares e 760 milhões de dólares em 2015 e 2020, respectivamente (Tabela 11.5). A maior demanda por peptidases nesse setor tem sido, historicamente, para o tratamento de enfermidades como infarto agudo do miocárdio e outras doenças relacionadas à formação de coágulos sanguíneos. Essas enzimas são utilizadas na formulação de trombolíticos, que são fármacos empregados para dissolver os trombos. A maior fabricante de enzimas trombolíticas é a Genentech, seguida por EKR Therapeutics, que produz a Retavase®. No entanto, a concorrência com outras drogas e o crescimento de tratamentos alternativos vêm alterando o mercado nos últimos anos, refletindo no uso cada vez maior de drogas como Botox® (Allergan Inc.) e Dysport® (Ipsen), formuladas à base da toxina botulínica²⁶. Esse novo mercado tem ultrapassado trombolíticos como o maior setor de aplicação de peptidases em produtos farmacêuticos. Peptidases também são componentes importantes e úteis em produtos biofarmacêuticos, tais como soluções enzimáticas para

remoção de impurezas em lentes de contato²⁷. As peptidases também são usadas em tratamentos de pele, ajudando no processo de cura natural de ulcerações, removendo de forma eficiente o material necrosado²⁸. O potencial de introdução de enzimas recombinantes com maior eficácia nesse setor ajudará a impulsionar o crescimento, reduzindo a média de preços desses produtos. Associado a isso, um número cada vez maior de consumidores está se voltando para o uso de enzimas digestivas como suplementos nutricionais, o que vem proporcionando um crescimento promissor nessa área²⁸.

Outro grande mercado em que as peptidases vêm sendo aplicadas é a indústria de couro, onde são utilizadas nas etapas de imersão, depilação e amaciamento. Por razões ambientais, esse setor industrial vem substituindo o uso de processos à base de sulfeto de hidrogênio e outros produtos químicos por bioprocessos à base de enzimas, que oferecem outras vantagens, como: fácil controle, aumento da velocidade de reação e redução na geração de rejeitos^{7,5,29}. Nesse contexto, as peptidases alcalinas com atividade elastinolítica e queratinolítica são as que vêm sendo mais utilizadas³⁰. Tradicionalmente, era mais comum o uso de enzimas pancreáticas nesses processos, porém há algum tempo o uso de peptidases microbianas vem substituindo essas enzimas de origem animal³¹.

O mercado com maior aplicação de peptidases é o de produtos de limpeza, que em 2010 correspondeu a cerca de 35% de toda a demanda mundial por peptidases, podendo chegar a um montante de 760 milhões de dólares e 940 milhões de dólares em 2015 e 2020, respectivamente (Tabela 11.5). Essas enzimas têm encontrado uso extensivo em detergentes tanto para máquinas de lavanderia quanto de louças. Atualmente, os principais mercados nesse setor estão nas regiões mais desenvolvidas da América do Norte e da Europa Ocidental, havendo forte pressão sobre os preços em consequência da grande concorrência entre as empresas líderes no mercado. O que ajudará a sustentar o crescimento na área será o uso de enzimas novas e com maior valor, que possam atender às preocupações ambientais e aos altos custos de energia, limpando melhor em temperaturas mais baixas. Em 2011, a Novozymes lançou Evity Blaze®, uma nova peptidase voltada para aplicações em máquinas de lavar louças. Entre os outros mercados de enzimas industriais, o de produtos de limpeza tem como tendência um forte crescimento à medida que novas enzimas sejam lançadas nos países desenvolvidos e uma maior inserção no mercado seja alcançada nos países em desenvolvimento, como o Brasil, por exemplo.

O Brasil responde por cerca de 60% do consumo total de enzimas na América Latina e, mesmo assim, o país importa muito mais (86%) do que

exporta (14%)³². Isso mostra um atraso tecnológico em relação à produção nacional de biocatalisadores, mas, ao mesmo tempo evidencia que a expansão da biocatálise é particularmente relevante para o Brasil, não somente pelo tamanho promissor do mercado interno para esse setor, como também porque existe no país o conhecimento necessário das tecnologias para a produção de enzimas em larga escala, por processos fermentativos e extrativos, assim como a maior biodiversidade do planeta como fonte de biocatalisadores³³. Além disso, a tecnologia enzimática concilia o desenvolvimento tecnológico com o uso de matérias-primas renováveis e com a preservação ambiental, questão fundamental para o país, visto que o meio ambiente brasileiro é um ativo de valor incalculável e que contribui decisivamente para a representatividade brasileira no cenário internacional. Agregar valor a essa biodiversidade parece ser uma das únicas formas que restaram para preservá-la. Nesse contexto, para que a biocatálise seja considerada uma ferramenta de rotina em processos economicamente sustentáveis e apresente vantagens competitivas, devem ser preenchidas condições básicas relacionadas à disponibilidade das enzimas, à previsibilidade do seu desempenho e seu custo³⁴. Portanto, para que isso ocorra, a produção de enzimas deve acontecer da forma mais econômica possível. Em processos biotecnológicos, uma estratégia para a condução de etapas de conversão microbiológica de baixo custo é a fermentação em estado sólido (FES)³⁵. Estima-se que por volta de 30% a 40% do custo envolvido na produção de peptidases devam-se ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos³⁶. Soma-se a isso o fato de que a economia brasileira é uma das mais importantes economias baseadas na agricultura no mundo e que o país tem papel de destaque na produção de biocombustíveis, colocando-se como um grande produtor agroindustrial³⁷. Consequentemente, essa grande produção é responsável pela geração de uma quantidade muito elevada de resíduos que causam sérios problemas ambientais^{38,39}. Portanto, a produção de peptidases e outras enzimas por FES pode ser uma estratégia promissora para o reaproveitamento desses coprodutos.

11.5 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA DE DETERGENTES

O primeiro detergente a utilizar enzimas, o Burnus®, é datado do ano de 1914, quando dois pesquisadores alemães, Rohm e Haas, usaram inicialmente peptidases produzidas por pâncreas de animais. Somente após 42 anos foi lançado o primeiro detergente contendo enzimas de origem bacteriana,

com o nome comercial de Bio-40^{®7}. Entretanto, foi só a partir dos anos 1960 que o mercado de detergentes enzimáticos despontou. As empresas Biotex, Denmarkunder Biotex, Novozymes e Novo Nordisk começaram a comercializar um poderoso detergente contendo em sua composição uma peptidase alcalina, a alcalase. O detergente produzido pela Novo Nordisk recebeu o nome comercial de Biotex[®] e contém em sua formulação uma peptidase produzida por *Bacillus licheniformis*. Após meados dos anos 1960, o mercado cresceu ainda mais devido à utilização de *pools* de diferentes enzimas na composição dos detergentes, tornando sua ação ainda mais eficiente, principalmente sobre manchas provenientes de alimentos complexos, que anteriormente requeriam a utilização de grandes quantidades de detergentes tradicionais. No entanto, por volta dos anos 1970, o mercado retrocedeu um pouco devido às reações alérgicas que alguns desses produtos provocaram em seus consumidores, problema que foi posteriormente resolvido com a introdução de produtos encapsulados.

Nos últimos 20 anos, o mercado de enzimas em detergentes cresceu quase dez vezes⁵. Em 2010, o setor de detergente representou 34% da venda total de peptidases, enquanto os setores de fármacos, alimentos e bebidas e outros produtos representaram 32%, 24% e 10%, respectivamente¹⁸⁻²⁰. Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated,¹⁸⁻²⁰ o mercado mundial de peptidases em produtos de limpeza foi avaliado em 415 milhões de dólares e 480 milhões de dólares em 2000 e 2005, respectivamente, tendo atingido cerca de 600 milhões de dólares em 2010. O mercado estimado para 2015 é de cerca de 760 milhões de dólares, com uma projeção de crescimento anual de mais ou menos 6,5%, chegando a 940 milhões de dólares até 2020 (Tabela 11.5).

As peptidases oriundas de micro-organismos são as enzimas mais amplamente exploradas no setor de detergentes⁴⁰⁻⁴². Nos últimos 30 anos, a importância dessas enzimas na formulação de detergentes aumentou significativamente, passando de pequenos aditivos a ingredientes-chave⁵. Atualmente, a grande maioria das peptidases usadas em detergentes é produzida por bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, sobretudo as do tipo serina-peptidases, como as subtilisinas e/ou peptidases ativas e estáveis em pH alcalino. Alguns dos produtos comerciais que contêm essas enzimas em sua formulação estão listados na Tabela 11.6^{5,7,43,44}. Novozymes, Novo Nordisk e Genencor International são os principais fornecedores de enzimas para detergentes, suprindo aproximadamente 95% do mercado global de peptidases (Tabela 11.6).

Tabela 11.6 Peptidases comerciais em formulações de detergentes

| NOME COMERCIAL | FONTE | INDÚSTRIA | FORMULAÇÃO PADRÃO | PROPRIEDADES |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------|--|
| Alcalase | <i>Bacillus licheniformis</i> | Novo Nordisk Novozymes | Granulado Líquido | Atuação em baixo pH (6,5 a 8,5) Utilização em lã |
| Alcalase Ultra | <i>Bacillus licheniformis</i> | Novo Nordisk Novozymes | Líquido | Atuação em baixo pH (6,5 a 8,5) Utilização em lã Substitui a utilização de borato |
| Durazym | <i>Bacillus</i> sp. | Novo Nordisk Novozymes | Líquido | – |
| Easzyme | Não especificado | Novozymes | Líquido | Estabilidade em sabão em barras Utilização em produtos de baixa qualidade |
| Esperase | <i>Bacillus lentus</i> | Novo Nordisk Novozymes | Líquido | – |
| Everlase | <i>Bacillus</i> sp. | Novo Nordisk Novozymes | Granulado Líquido | Compatibilidade com outras enzimas Utilização em detergentes multienzimáticos Tolerante a alvejantes |
| Kannase | <i>Bacillus</i> sp. | Novo Nordisk Novozymes | Líquido | Lavagem a frio |
| Liquanase | Não especificado | Novozymes | Líquido | Atuação em baixas temperaturas Remoção de manchas sanguíneas |
| Liquanase Ultra | Não especificado | Novozymes | Líquido | Branqueador Agente antirre deposição Elimina a necessidade de borato |
| Ovozyme | <i>Bacillus</i> sp. | Novo Nordisk Novozymes | Líquido | Detergente para lava-louças |
| Polarzyme | <i>Bacillus</i> sp. | Novozymes | Granulado | Atuação em baixa temperatura Utilização em detergentes para mãos |
| Properase | <i>Bacillus</i> sp. | Genencor International | Líquido | Atuação em baixa temperatura e elevado pH |
| Purafect | <i>Bacillus lentus</i> | Genencor International | Líquido | Atuação em elevado pH |
| Savinase | <i>Bacillus</i> sp. | Novo Nordisk Novozymes | Granulado Líquido | Atuação em baixa temperatura e elevado pH Utilização em detergentes em pó |
| Savinase Ultra | <i>Bacillus</i> sp. | Novo Nordisk Novozymes | Líquido | Atuação em baixa temperatura e elevado pH Utilização em detergentes em pó Substitui a utilização de borato |

Fonte: Adaptado de Ray (2012)⁶, Jisha et al. (2013)⁸, Kirk et al (2002)⁴³, Kumar et al. (2008)⁴⁴.

As peptidases consideradas ideais para aplicação em detergentes devem possuir uma ampla especificidade para diversos substratos, facilitando a remoção de uma grande variedade de manchas provenientes de diferentes tipos de alimentos, sangue e outras secreções corporais^{5,45}. As peptidases atuam melhorando o desempenho na remoção de manchas sem afetar a cor dos tecidos, degradando componentes específicos nas menores partes solúveis em água, o que facilita a remoção da sujeira durante a lavagem. Diferentemente dos clareadores, que apenas encobrem as manchas, as peptidases realmente as degradam. Essa característica é bastante importante porque os resíduos dessas manchas podem atuar como uma espécie de cola e atrair partículas de sujeira presentes na água de lavagem, resultando no envelhecimento do tecido e em roupas sujas. Além disso, as enzimas combinadas com surfactantes são excelentes na remoção de manchas, pois degradam a sujeira, enquanto os surfactantes removem essa sujeira degradada. Outros pontos positivos relacionam-se à diminuição do uso de produtos químicos, como solventes e substâncias cáusticas, tornando os detergentes menos agressivos ao usuário e ao meio ambiente. Existem, também, vantagens com relação ao consumo de água e de energia⁴⁵. Para a avaliação do desempenho de um detergente são realizados testes com roupas manchadas, e a eficiência do produto é mensurada visualmente ou por quantificação da refletância luminosa do tecido⁴⁶⁻⁴⁹.

O detergente necessita de peptidases capazes de ter atividade em condição de alcalinidade e em uma ampla faixa de temperatura. Um importante parâmetro na escolha das peptidases para detergentes é o valor do seu ponto isoelétrico (pI), porque essas enzimas agem melhor quando o valor do pH das soluções de detergentes é semelhante ao pI da enzima. Além disso, outros parâmetros devem ser levados em consideração para a seleção de peptidases com possibilidades de aplicação em detergentes, tais como: compatibilidade com os componentes do detergente (surfactantes, perfumes e branqueadores)⁵⁰⁻⁵², eficiência na remoção das manchas, boa estabilidade para tempo de prateleira e boa atividade na temperatura de lavagem a quente. Contudo, com o aumento do uso de materiais sensíveis a temperaturas elevadas, tais como fibras sintéticas na fabricação de roupas, o setor foi incentivado a buscar novas enzimas que atuassem em temperaturas baixas^{47,53,54}. Nesse sentido, já existe no mercado um produto denominado Kannase®, comercializado pela empresa Novo Nordisk, que contém uma peptidase eficiente e com capacidade de atividade em uma faixa de temperatura variando entre 10 °C e 20 °C⁵. Como as enzimas utilizadas na formulação de detergentes precisam ser estáveis nas diferentes condições citadas anteriormente, a

demanda tem direcionado o interesse industrial para a engenharia genética e de proteínas, para a obtenção de enzimas modificadas com maior estabilidade^{3,55}. Considerando, porém, a infinita diversidade microbiana, sempre há uma chance de encontrar micro-organismos que produzam novas enzimas com propriedades mais adequadas para essa exploração comercial.

11.6 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

O uso de enzimas como agentes modificadores de propriedades funcionais de proteínas tem sido amplamente difundido na indústria de alimentos. Dentro desse contexto, as peptidases têm um papel de destaque devido às suas aplicações no campo comercial, bem como as inúmeras vantagens que apresentam em relação a outros agentes utilizados com o mesmo propósito, como os catalisadores químicos. As fontes tradicionais de peptidases empregadas na indústria de alimentos são as obtidas de tecidos animais e vegetais, como exemplificado na Tabela 11.7. Entretanto, como as enzimas de origem animal e vegetal não conseguem atingir a grande demanda mundial⁴, esse fato tem promovido um aumento da utilização de peptidases de origem microbiana (Tabela 11.8)^{3,5,40}.

Algumas peptidases obtidas de plantas e animais continuam amplamente em uso devido à sua eficácia bem estabelecida em alguns processos fundamentais na produção de queijos e carnes processadas (Tabela 11.7). Dentre estas, destacam-se: (1) a papaína, bem como a bromelina e a ficina, no amaciamento da carne; e (2) a quimosina, em conjunto com a pepsina, na fase de coagulação do leite para a produção de queijos. A quimosina (extraída do abomaso, que é o quarto estômago dos ruminantes) é substituída em alguns países pela quimosina recombinante, produzida pela fermentação de leveduras e fungos contendo genes clonados para essa peptidase. Contudo, a quimosina natural ainda é a preferida por muitos produtores tradicionais de queijo, apesar das vantagens da oferta e da pureza do produto produzido por fermentação^{4,43,56}. As tripsinas de origem bovina e suína ainda são utilizadas para a produção de hidrolisados proteicos como ingredientes flavorizantes; no entanto, existem alternativas de origem microbiana disponíveis atualmente no mercado, como as serina-peptidases clássicas (Tabela 11.8).

Tabela 11.7 Peptidases provenientes de animais e plantas utilizadas na indústria de alimentos

| ENZIMA | FONTE | APLICAÇÃO |
|-----------|--|---|
| Papaína | Látex dos frutos verdes de papaia (<i>Carica papaya</i>) | Amaciamento de carnes; prevenção de turvação na cerveja |
| Bromelina | Suco do talo do abacaxi (<i>Ananas comosus</i>) | Amaciamento de carne |
| Ficina | Látex de figueiras tropicais (<i>Ficus carica</i>) | Idem à bromelina e a papaína, mas não amplamente utilizada devido ao custo |
| Tripsina | Bovina/suína | Produção de hidrolisados de aromas alimentícios (principalmente substituído por peptidases microbianas) |
| Quimosina | Abomaso de bezerro | Coagulação do leite para produção de queijos |
| Pepsina | Abomaso de bovino | Usualmente presente com quimosina como parte do coalho |

Fonte: Adaptado de Rao et al. (2013)⁴, Ray et al. (2012)⁶, Jisha et al. (2013)⁸, Birschbach et al. (2004)²³ e Kirk et al. (2002)⁴³.

Tabela 11.8 Peptidases provenientes de micro-organismos utilizadas na indústria de alimentos

| NOME COMERCIAL | FONTE | INDÚSTRIA | PROPRIEDADES |
|-----------------------------------|--|---------------------------|---|
| Accelerezyme | Não especificada | DSM | Desenvolvimento de sabor durante preparo de queijo |
| Acid fungal Protease | <i>Aspergillus</i> sp. | Genencor International | Hidrólise de proteínas |
| Acid protease A | <i>Aspergillus niger</i> | Amano Pharmaceuticals | Hidrólise de proteínas em pH 3,0 |
| Acid protease DS | <i>Aspergillus niger</i> | Amano Pharmaceuticals | Suplemento dietético |
| Alcalase | <i>Bacillus licheniformis</i> | Novo Nordisk Novozymes | Processamento de carne, melhoria da fermentação do álcool combustível |
| BakeZyme B500BG | <i>Aspergillus</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. | DSM | Panificação |
| Biofeed pro | <i>Bacillus licheniformis</i> | Novo Nordisk | Alimentação |
| Enzeco neutral bacterial Protease | <i>Bacillus subtilis</i> | Enzyme Development | Alimentos, amaciamento de carne |
| Enzeco neutral bacterial Protease | <i>Bacillus subtilis</i> | Enzyme Development | Hidrólise de proteínas vegetais (pH 6,0-9,5) |

| NOME COMERCIAL | FONTE | INDÚSTRIA | PROPRIEDADES |
|----------------------|---|------------------------|--|
| Flavorzyme | <i>Aspergillus oryzae</i> | Novo Nordisk | Hidrolisado proteico (mistura de exo e endopeptidases) |
| Fromase | <i>Rhizomucor miehei</i> | DSM | Coagulante fúngico para preparo de queijo |
| Fungal protease | <i>Aspergillus</i> sp. | Genencor International | Hidrólise de proteínas de laticínios |
| HT proteolytic | <i>Bacillus</i> sp. | Genencor International | Hidrólise de proteínas em elevadas temperaturas |
| Kojizyme | Não especificada | Novo Nordisk | Hidrolisado proteico |
| Multifect neutral | <i>Bacillus</i> sp. | Genencor International | Hidrólise de proteínas em pH neutro |
| Neutrase | <i>Bacillus subtilis</i> | Novo Nordisk | Panificação e cervejaria |
| Newlase F | <i>Rhizopus niveus</i> | Amano Pharmaceuticals | Hidrólise de proteínas em pH 3,0 |
| Protamex | Complexo de peptidases de <i>Bacillus</i> | Novo Nordisk | Produção de hidrolisados proteicos, desenvolvimento de sabor e processamento de carne. |
| Protease A-DS | <i>Aspergillus oryzae</i> | Amano Pharmaceuticals | Suplemento dietético |
| Protex | <i>Bacillus</i> sp. | Genencor International | Hidrólise de proteínas em pH alcalino |
| Suparen/ Surecurd | <i>Cryphonectria parasitica</i> | DSM | Coagulante fúngico para preparo de queijo |

Fonte: Adaptado de Rao et al. (2013)⁴, Ray et al. (2012)⁶, Jisha et al. (2013)⁸, Birschbach et al. (2004)²³ e Kirk et al. (2002)⁴³.

11.6.1 Produção de queijos

As enzimas que atuam na coagulação do leite podem ser agrupadas em três categorias: (i) coalhos de origem animal, (ii) coagulantes de origem microbiana e (iii) quimosina obtida por engenharia genética. Tanto as peptidases de origem animal quanto as microbianas que agem na coagulação do leite são peptidases ácidas⁴. Na produção de queijos obtidos por coagulação enzimática, a principal função das peptidases é a desestabilização da estrutura das moléculas de caseína, que são fosfoproteínas insolúveis em pH 4,6, e que existem no leite na forma de estruturas coloidais, as micelas, cuja principal função é fluidificar as moléculas de caseína e solubilizar os íons

cálcio e fosfato⁵⁶. A hidrólise específica da ligação peptídica da caseína entre os resíduos de fenilalanina 105 e metionina 106 resulta na para- κ -caseína insolúvel (resíduos de aminoácidos de 1 a 105), que permanece associada à micela de caseína, e um peptídeo solúvel (denominado de glicomacropeptídeo, que corresponde aos resíduos de aminoácidos 106 a 169). Devido à alta especificidade por caseína, a quimosina é preferida neste processo. Contudo, peptidases produzidas por micro-organismos como *Mucor michei*, *Bacillus subtilis* e *Cryphonectria parasitica* estão sendo incorporadas nesse tipo de produção⁴ (Tabela 11.8).

11.6.2 Produtos da soja e hidrolisados proteicos

Peptidases alcalinas e neutras de origem fúngica são capazes de atuar no processamento das proteínas da soja, promovendo modificações estruturais, que aumentam suas propriedades funcionais. Tais alterações resultam em maior solubilidade dos hidrolisados, culminando com maior rendimento proteico e baixo amargor (Tabela 11.8). Os hidrolisados são empregados em bebidas enriquecidas com proteínas e na formulação de alimentos dietéticos^{4,24}.

Os hidrolisados proteicos são utilizados, ainda, em formulações para lactantes, em suplementos dietéticos clínicos e em agentes aromatizantes. Todavia, uma das principais barreiras para o uso de hidrolisados proteicos em produtos dietéticos é o sabor amargo que possuem, sendo que a intensidade desse sabor é proporcional ao número de aminoácidos hidrofóbicos e resíduos de prolina no centro do peptídeo. Peptidases capazes de hidrolisar ligações peptídicas envolvendo aminoácidos hidrofóbicos e resíduos de prolina, como a carboxipeptidase A, são capazes de diminuir o sabor amargo desses hidrolisados^{4,24}.

11.7 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA DE QUÍMICA FINA

Peptidases de animais e plantas, incluindo papaína, quimiotripsina, termolisina e subtilisina, vêm sendo utilizadas como catalisadores na síntese de peptídeos⁵⁷. Dessa forma, em condições apropriadas, peptidases catalisam não somente a hidrólise de peptídeos, mas também a formação de ligações peptídicas, gerando oligopeptídeos. Vários peptídeos biologicamente ativos foram sintetizados usando peptidases como catalisadores, através de reações

de condensação⁵⁸. Na síntese enzimática de peptídeos, geralmente são obtidos polímeros de baixa massa molecular como di ou tripeptídeos. Tais biomoléculas têm aplicação reconhecida na indústria farmacêutica e agroquímica, bem como na nutrição animal e humana. Alguns exemplos incluem: (1) a produção do adoçante aspartame, um dipeptídeo composto por L-ácido aspártico e metil-éster da L-fenilalanina, que é enzimaticamente produzido através de catálise reversa, utilizando-se preparações de termolisina (uma metalo-peptidase) derivada de *Bacillus thermoproteolyticus*; e (2) a síntese de fármacos como quiotorfina, encefalina, dinorfina e angiotensina⁵⁹. Outro exemplo da aplicação de peptidases na química fina é a produção enzimática de insulina humana semissintética a partir de insulina suína⁶⁰.

A síntese enzimática de peptídeos apresenta vantagens em relação à síntese química, como: a elevada estereo e regioespecificidade, a ausência de racemização e de outras reações secundárias típicas da síntese química, a proteção parcial das cadeias laterais dos substratos e o uso de condições mais brandas e seguras de reação⁶¹. Contudo, o fato de não existir uma enzima universal para essa finalidade faz com que a metodologia não seja geral ou aplicável a qualquer sequência peptídica. Portanto, o uso de peptidases na síntese de peptídeos tem limitações. As reações de catálise ocorrem geralmente em meios não aquosos, o que pode levar à desnaturação e desativação da enzima. Neste contexto, vários métodos vêm sendo descritos para estabilização enzimática, tais como: imobilização química, engenharia de proteína e evolução direcionada. A descoberta de peptidases estáveis em solventes orgânicos também surge como um fato promissor para a biocatálise na indústria de química fina^{62,63}.

11.8 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E COSMÉTICA

Pode-se afirmar que, atualmente, a indústria farmacêutica representa um dos maiores produtores e usuários de enzimas. O mercado de enzimas é considerado hoje o mais promissor para as indústrias farmacêuticas e uma única enzima com aplicação terapêutica pode, por exemplo, custar 5 mil dólares por grama⁶⁴. Nesse contexto, a aplicação de peptidases na indústria farmacêutica e de cosméticos vem crescendo a cada ano, devido à pesquisa de novas aplicações e da descoberta de novas fontes produtoras dessas enzimas. O uso de peptidases em medicamentos e cosméticos se justifica pela sua alta especificidade e eficiência catalítica, além de envolver a diminuição do uso de compostos químicos, muitas vezes tóxicos. Assim sendo, a relevância

do uso de enzimas como medicamento relaciona-se com o fato de que pequenas quantidades do catalisador biológico podem produzir efeitos bastante específicos em condições fisiológicas⁶⁵. No entanto, ainda existem dificuldades na aplicação de enzimas em geral na indústria farmacêutica e de cosméticos, em função da dificuldade em conciliar a segurança da formulação, evitando reações irritantes ou sensibilizantes e a possível imunogenicidade das enzimas, com a funcionalidade e a estabilidade das enzimas na presença dos diferentes componentes da formulação e no seu armazenamento⁶⁶. Além desses fatores, as peptidases precisam ter alta atividade e estabilidade em pH fisiológico, sem danos causados pelos componentes dos diversos fluidos corporais⁶⁷. De acordo com a finalidade, as formulações que contêm enzimas podem ser administradas por via tópica, oral ou parenteral, sendo que para as enzimas utilizadas em aplicações digestivas e tópicas não são fundamentais critérios como pureza e fonte da enzima. No entanto, o uso parenteral de enzimas requer alto grau de pureza, o que pode aumentar o custo de produção^{65,66}.

Apesar da longa lista de micro-organismos produtores, envolvendo bactérias e fungos, apenas uma minoria pode ser empregada como fonte de peptidases para a indústria farmacêutica e de cosméticos, devido à necessidade de não serem espécies patogênicas ao homem, o que é reconhecido pela sigla GRAS (do inglês, *generally recognized as safe*), que pode ser traduzido como “geralmente considerado como seguro” e implica na complexa ausência de toxinas microbianas².

Peptidases apresentam diversas aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos, sendo utilizadas na produção de medicamentos e no desenvolvimento de novos produtos. Na indústria de cosméticos, a denominada “enzimocosmética” tem como principal alvo a pele, seja para sua limpeza profunda (esfoliação e tratamento de acne e caspa), cicatrização ou tratamento depilatório. Na indústria de cosméticos, buscam-se peptidases de baixa massa molecular e alta lipofilicidade para sua maior penetração na pele, características que normalmente não são encontradas em enzimas em geral⁶⁸. Atualmente, a diversidade de aplicação de peptidases na indústria farmacêutica vai desde auxiliar a digestão até o debridamento e a cicatrização de feridas (Tabela 11.9).

Tabela 11.9 Peptidases utilizadas na indústria farmacêutica

| ENZIMA | FONTE | USO |
|-----------------|--|--|
| Bromelaína | Caule de <i>Ananas comosus</i> | Empregada em processos inflamatórios (de origem traumática, cirúrgico-infecciosa, vascular e reumática), digestão e tratamento auxiliar de queimaduras de grau elevado |
| Colagenase | <i>Clostridium histolyticum</i> | Úlceras de pele |
| Estreptoquinase | <i>Streptococcus</i> β -hemolítico | Coágulo sanguíneo (agente fibrinolítico) |
| Papaína | Látex de <i>Carica papaya</i> | Digestão (principalmente pacientes com dispepsia crônica e gastrite), vermífugo (nematicida) |
| Pepsina | Estômago suíno | Auxiliar de digestão |
| Quimiotripsina | Pâncreas bovino | Auxiliar de digestão |
| Serrapeptase | <i>Serratia</i> E15 | Inflamação |
| Tripsina | Pâncreas bovino | Auxiliar de digestão, debridamento de úlceras |

Fonte: Adaptado de Ray (2012)⁶, Jisha et al. (2013)⁸ e Craik et al. (2011)¹⁴.

11.8.1 Peptidases como auxiliares digestivos: função anti-inflamatória e tratamento de cáries

O uso de peptidases como auxiliares na digestão de proteínas é o mais tradicional e emprega diversas peptidases, como a pepsina de estômago suíno, a quimiotripsina e a tripsina obtidas de pâncreas bovino, a bromelaína obtida do caule da planta do abacaxi e a papaína do látex do mamoeiro. A papaína também é auxiliar digestivo em pacientes com dispepsia crônica e gastrite e tem atividade nematicida⁶⁷.

Algumas das peptidases usadas como auxiliares digestivos apresentam outras aplicações terapêuticas. A bromelaína também pode ser utilizada na medicina popular como agente cicatrizante. Além disso, atua no bloqueio tópico de alguns metabólitos pró-inflamatórios que aceleram e agravam o processo inflamatório, como cininogênio e bradicinina. É, por isso, um agente anti-inflamatório, podendo ser utilizado no caso de lesões desportivas, traumas, artrites e outros tipos de inflamações, como sinusites⁶⁹. Também foi demonstrado que a bromelaína, quando administrada por via oral, reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, o que

explicaria sua atuação na colite ulcerativa, na síndrome do cólon irritável e na doença de Crohn⁶⁹, que é uma doença crônica inflamatória intestinal (que se apresenta sob três formas principais: inflamatória, fistulosa e fibroestenotante) capaz de atingir geralmente o íleo e o cólon (mas pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal). Uma peptidase produzida pela cepa de *Serratia* denominada E-15, normalmente encontrada no intestino do bicho-da-seda, também apresenta ação anti-inflamatória e fibrinolítica. Conhecida comercialmente como Peptizyme®SP ou Danzen®, a denominada serratiopeptidase é administrada por via oral e rapidamente absorvida pelo epitélio intestinal, porém a falta de evidências científicas quanto à sua eficácia, segurança e tolerabilidade não preconizam o seu uso⁷⁰.

A papaína também pode atuar como agente anti-inflamatório e pode ser usada no tratamento de cáries. As lesões de cárie na dentina surgem como consequência da ação de bactérias acidogênicas. Esta camada da dentina mostra-se amolecida e sem possibilidade de reorganização devido à desnaturação irreversível das fibras de colágeno. A papaína interage com o colágeno parcialmente degradado do tecido necrosado da lesão da cárie, provocando um amolecimento adicional deste tecido e facilitando sua retirada mecânica. Essa ação enzimática se dá apenas no tecido necrosado, pois tecidos saudáveis contêm um inibidor de peptidase que impede a ação dessa classe de enzimas. Assim, a dentina não necrosada, com possibilidade de regeneração, é preservada. O produto, denominado PapaCarie®, associa a enzima com a cloramina, um agente antisséptico⁷¹. A papaína também pode ser incorporada a pastas dentífricas, auxiliando a remoção de resíduos alimentares e da placa bacteriana pouco aderida⁶⁸.

11.8.2 Peptidases usadas como agentes fibrinolíticos e na coagulação

Algumas peptidases também são usadas como agentes fibrinolíticos, tendo como alvo principal o processo de coagulação sanguínea que leva à formação de trombos. Embora a formação de coágulos e sua degradação sejam mantidas em equilíbrio em sistemas biológicos, o bloqueio da sua lise leva aos processos de trombose. A uroquinase, enzima normalmente purificada da urina humana (ou ativador de plasminogênio tipo uroquinase), tem como principal substrato o plasminogênio, que é a forma inativa da plasmina, uma serina-peptidase. A ativação da plasmina desencadeia uma cascata proteolítica que, dependendo do ambiente fisiológico, participa do processo

de trombólise ou degradação da fibrina (presente no coágulo). Devido ao seu papel ativador da plasmina, a uroquinase (Abbokinase®) é usada como um agente trombolítico/fibrinolítico para o tratamento de doenças vasculares, como trombose venosa, embolismo pulmonar, infarto do miocárdio e isquemias ou derrames cerebrais⁷². Sua administração intravenosa deve ser realizada de forma imediata, para que se atinja a eficácia terapêutica. Outra enzima usada com a mesma atividade é o ativador tecidual de plasminogênio, uma serina-peptidase encontrada em células endoteliais que apresenta a mesma atividade da uroquinase, porém com maior afinidade pela trombina. Atualmente, é mais utilizada uma de suas formas recombinantes, Alteplase® ou Reteplase®, expressa em *Escherichia coli*, sendo que a Reteplase® apresenta maior meia-vida⁷³.

Micro-organismos também podem ser fontes de enzimas com atividade fibrinolítica. A administração oral de uma enzima fibrinolítica, nattokinase, produzida por uma cepa de *Bacillus* em uma tradicional comida fermentada japonesa, Natto®, elevou a atividade fibrinolítica no plasma e a produção do ativador tecidual de plasminogênio, o que sugere sua possível utilização na profilaxia de trombozes⁷⁴. A estreptoquinase, obtida do sobrenadante de cultivo de bactérias do gênero *Streptococcus* (beta-hemolítico), é outra enzima utilizada na ativação do plasminogênio humano, de modo que se trata de um medicamento fibrinolítico de menor custo em comparação aos anteriores, sendo comercializado com o nome Streptase®. No entanto, uma das principais limitações dessa terapia é a resposta antigênica, que pode chegar a reações anafiláticas graves⁷². A estreptoquinase também é útil na prevenção de aderências pós-operatórias, uma complicação cirúrgica muito comum, principalmente em intervenções abdominais, e que leva a obstruções abdominais. A liberação contínua de estreptoquinase na cavidade peritoneal, quando imobilizada em uma membrana, é capaz de reduzir de forma significativa os casos de aderência⁷⁵.

Neste mesmo tópico, também é importante realçar que o Fator VIIa da coagulação sanguínea, uma serina-peptidase que inicia o processo de formação de coágulos, tem sido usado na terapia de reposição enzimática, especificamente em pacientes hemofílicos. Uma forma recombinante do Fator VIIa, NovoSeven®, tem sido aplicada em pacientes com deficiência congênita dessa proteína ou em casos de sangramentos descontrolados⁷⁶. Dessa forma, o tratamento de deficiências enzimáticas torna-se um campo de aplicação dos mais relevantes para as enzimas terapêuticas⁶⁷.

11.8.3 Aplicações das queratinases

Além das peptidases já mencionadas que são utilizadas na indústria farmacêutica e de cosméticos, as collagenases, elastases e queratinases apresentam grande aplicação, por atuarem em componentes de matriz extracelular e do extrato córneo, e cuja hidrólise pode facilitar tratamentos dermatológicos e cosméticos³⁰.

As queratinases formam uma classe particular de peptidases pela sua capacidade em hidrolisar a queratina, uma proteína estrutural insolúvel de difícil degradação. A forte compactação da queratina se deve à estabilização por várias ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, além das diversas pontes dissulfeto que conferem estabilidade mecânica e resistência à degradação pela maioria das peptidases, como papaína, tripsina e pepsina⁷⁷. A queratina está presente em diversos materiais, como couro, cabelo, unhas, lã, penas e extrato córneo da pele, e, apesar da queratina do cabelo e da unha ter a mesma estrutura da encontrada na epiderme, existem diferenças na quantidade de pontes dissulfeto, o que faz a primeira ser bem mais resistente à hidrólise³⁰. Embora apresentem elevada resistência à degradação, queratinas podem ser hidrolisadas por queratinases de origem microbiana, apresentando importante papel biotecnológico³⁰ e crescente impacto nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos⁷⁸.

As queratinases podem ser úteis em formulações tópicas para a eliminação da queratina na acne e psoríase e remoção de calos⁷⁹. A acne é uma inflamação das glândulas sebáceas da pele, responsáveis pela produção do sebo, formado por diversos tipos de gordura. O sebo é normalmente liberado pelos folículos pilossebáceos, compostos por um pelo e uma glândula sebácea, presentes na camada intermediária da derme. Quando um espessamento da pele provoca a obstrução do folículo, o sebo fica retido e forma um cravo ou comedão, que é seguido pela proliferação de bactérias anaeróbias, dando origem à acne ou espinhas. Para o tratamento da acne, é preciso promover a abertura dos poros, regularizando o funcionamento das glândulas sebáceas pela remoção de substâncias do próprio sebo, restos proteicos e a queratina da pele – neste ponto, entram em ação queratinases e peptidases em geral, além das lipases. As queratinases atuam promovendo a abertura dos poros, removendo a queratina que normalmente bloqueia a saída do conduto da glândula sebácea, o que contribui para o controle da acne. Além disso, as queratinases também podem ser incluídas em sabonetes faciais para o tratamento da acne, pois células mortas podem fechar os poros e criar um ambiente favorável ao desenvolvimento da acne. Essas enzimas também

podem atuar na remoção de manchas e na regeneração do epitélio, acelerando o processo de cicatrização⁷⁷. Para a cicatrização, é frequente a ação de peptidases em tecidos com lesões, em que podem ser encontradas secreções e diferentes micro-organismos, e que por isso apresentam dificuldades na cicatrização. A presença de diferentes peptidases, como papaína, bromelaína, queratinases e collagenases, facilita a hidrólise proteica, o que acelera o processo de cicatrização⁶⁸.

Vários produtos para *peeling* enzimático, visando à renovação celular, têm, em sua composição, Arazyme®, uma peptidase termorresistente de amplo espectro (capaz de degradar albumina, queratina, colágeno e elastina) produzida pela bactéria *Serratia proteamaculans*, que vive mutuamente dentro do trato digestório da aranha *Nephila clavata*, de origem coreana. Esse produto promove a esfoliação gradual e progressiva do extrato córneo da pele, removendo a queratina de peles secas e suavizando as imperfeições da superfície da pele⁸⁰. Outras enzimas usadas em *peeling* enzimático são tripsina, papaína e bromelaína, que diminuem o espessamento da pele.

O processo de esfoliação envolve a renovação celular da pele e, para tal, normalmente é utilizada uma combinação de peptidases e lipases, que em conjunto facilitam o processo natural de descamação da epiderme. Na pele classificada como normal, queratinócitos produzidos na camada basal da epiderme são eliminados pelo extrato córneo, camada mais externa, através de descamação; no entanto, qualquer alteração nesse equilíbrio, seja pela maior produção de queratinócitos ou por falhas na descamação, pode levar a uma maior coesão dessas células na superfície. Um dos principais componentes responsável por essa coesão é o desmossoma, no qual várias proteínas transmembranares de células adjacentes interagem entre si, aumentando a coesão⁸¹. Para manter a integridade tecidual durante a descamação normal da pele, as proteínas do desmossoma são progressivamente degradadas por peptidases do tipo tripsina e quimotripsina^{82,83}. Na pele seca, há uma diminuição da atividade dessas peptidases em relação à pele normal, com o respectivo aumento no nível de proteínas de desmossomas, ocasionando uma maior coesão celular seguida de liberação das células na forma de agregados⁸⁴. Dessa forma, a suplementação com peptidases aplicadas de forma tópica representa um potencial tratamento para aliviar o aspecto da pele seca⁸⁵. É também possível o uso de queratinases, devido ao grande acúmulo de queratina nas células da epiderme, mas diferentes peptidases podem ser utilizadas. O mesmo ocorre no tratamento da caspa, ou dermatite seborreica, em que ocorre a descamação excessiva do couro cabeludo devido ao crescimento do fungo *Malassezia furfur*. Esse fungo é um componente

comum do couro cabeludo, porém pode ter seu crescimento aumentado pela presença de sebo secretado pelos folículos pilosos no couro cabeludo. Esse crescimento causa uma irritação que acelera a descamação, misturando-se ao sebo e formando placas de células do extrato córneo visíveis a olho nu. Seu tratamento envolve também o uso de peptidases e lipases⁸⁶. Xampus anticaspa também incluem queratinases, pois a atividade queratinolítica permite a remoção de células mortas no couro cabeludo em descamação, em associação com antifúngicos.

A queratina é o principal componente do calo, espessamento da pele devido ao excesso dessa proteína e também denominado hiperqueratose. A degradação da queratina nessa condição por *Kytococcus sedentarius* já foi observada, o que possibilita o seu uso. Essa bactéria é produtora de duas peptidases com atividade queratinolítica, e já foi observado que essas enzimas são responsáveis pela doença conhecida como queratólise erosiva, caracterizada pela descamação da camada córnea da epiderme, principalmente na palma das mãos e planta dos pés, pela hidrólise da queratina⁸⁷.

Queratinases também têm participação como enzimas depilatórias, solubilizando a queratina do pêlo, e para alisamento capilar; neste último caso alterando a disposição das pontes dissulfeto na queratina do cabelo. Nesse sentido, as queratinases também têm atraído o interesse das indústrias farmacêuticas e de cosméticos porque muitas dessas enzimas não são capazes de hidrolisar gelatina e colágeno, e então sua ação depilatória não afeta a pele, embora sua atividade seja mais lenta do que a dos depiladores convencionais⁸⁸.

O uso de queratinases para a administração de medicamentos também está sendo investigado. A eficácia da terapia tópica para doenças de unhas é normalmente limitada pela baixa permeabilidade das drogas a esse epitélio. Nesse sentido, o uso de queratinases aumenta a penetração de drogas pelo epitélio ao reduzir a integridade da unha por meio da hidrólise da queratina⁸⁹. Esses resultados sugerem que as enzimas queratinolíticas aumentam a permeabilidade da unha a drogas aplicadas de forma tópica, o que é muito necessário no caso do tratamento da psoríase. Nessa doença, há uma grande reciclagem e descamação das células da epiderme.

Algumas queratinases de amplo espectro já demonstraram atividade hidrolítica contra proteínas do príon, responsáveis por várias doenças neurodegenerativas transmissíveis pelo contato com tecido infectado, fluidos corporais ou instrumentos médicos contaminados e que normalmente são resistentes à hidrólise pela maioria das peptidases e aos processos tradicionais de esterilização^{90,91}. Dessa forma, as enzimas queratinolíticas

apresentam enorme potencial de aplicação na indústria farmacêutica, como, por exemplo, na descontaminação de instrumentos médicos e equipamentos laboratoriais.

11.8.4 Aplicações das collagenases e elastases

As collagenases e as elastases, outras duas enzimas importantes para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos, atuam respectivamente sobre as fibras de colágeno e elastina, que em combinação determinam as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo de animais. Como a queratina, a elastina e o colágeno são proteínas insolúveis e recalcitrantes à hidrólise pela maioria das peptidases, porém suas estruturas são bem diferentes. Além da ausência de inúmeras pontes dissulfeto, o colágeno é uma proteína fibrosa, enquanto a elastina não apresenta essa característica, e ambas as estruturas quaternárias são estabilizadas por ligações peptídicas entre unidades de lisina, o que dá a resistência à hidrólise. As collagenases e elastases são enzimas que atuam na remoção de cicatrizes e queloides, debridamento de queimaduras e úlceras dérmicas, e muitas vezes são associadas com bromelina e papaína⁶⁸. A cicatrização de uma ferida envolve uma sucessão de etapas, que incluem migração de queratinócitos, angiogênese, deposição de fibroblastos e remodelamento de tecido de granulação, todas necessitando da degradação controlada da matriz extracelular. Qualquer alteração no balanço entre a produção de matriz extracelular e sua degradação leva à formação de úlceras crônicas, situação em que há excessiva degradação da matriz extracelular, ou leva à formação de fibrose, com cicatrizes hipertróficas ou queloides, caracterizados pelo acúmulo de componentes da matriz extracelular⁹². Preparações de elastases purificadas da bactéria *Bacillus subtilis* foram imobilizadas em bandagens, denominadas Elastoterase®, para aplicações terapêuticas em queimaduras, edemas, furúnculos e abscessos^{2,93}. Uma collagenase purificada do crescimento da bactéria *Clostridium histolyticum* é utilizada em pomadas (Santyl®) para o tratamento de feridas, como úlceras crônicas e queimaduras, facilitando a cicatrização. Sua atuação visa promover o debridamento ou remoção do tecido em necrose, sem danificar o tecido sadio ao redor⁹⁴. Essa bactéria é a principal produtora de collagenases com aplicações terapêuticas, embora outros micro-organismos também sejam capazes de produzir essa classe de peptidases⁶⁵. Outras preparações enzimáticas comerciais de uso tópico contendo peptidases são empregadas na cicatrização de feridas, dentre as quais a Fibrase®, contendo plasmina (fibrinolisinase) de origem

bovina que é capaz de hidrolisar a fibrina presente no tecido necrosado, sem afetar o tecido sadio ao redor⁶⁴.

Ao atuar sobre as fibras de colágeno, as collagenases também geram peptídeos com diversas atividades biológicas²; neste aspecto, foi comprovado que o colágeno é um dos antígenos envolvidos com o desenvolvimento da artrite reumatoide humana, e a ação de collagenases libera um peptídeo imunodominante cuja administração oral em modelo murino sugere o seu potencial uso imunoterapêutico no tratamento dessa patologia⁹⁵. As collagenases com atividade em pH alcalino estão sendo cada vez mais estudadas para aplicações terapêuticas nas quais se deseja a formulação de preparações de liberação lenta².

O produto conhecido como Xiaflex[®] é uma injeção composta pela collagenase purificada de *Clostridium histolyticum* usada no tratamento de adultos com contratura de Dupuytren, uma doença que provoca o progressivo espessamento e o encurtamento da matriz extracelular ao redor das fibras musculares da palma da mão, com consequente contração e encurvamento dos dedos. A enzima, ao ser injetada, provoca a hidrólise do colágeno e, assim, o relaxamento das fibras musculares, evitando o processo cirúrgico⁹⁶. As collagenases também são investigadas como uma opção de tratamento não cirúrgico para a doença de Peyronie, através de injeções que promoveriam a hidrólise do excesso de colágeno, diminuindo o tamanho das placas que provocam a doença⁹⁷. A doença de Peyronie é um distúrbio do tecido conjuntivo que envolve o crescimento de placas fibrosas no tecido do pênis, afetando cerca de 1% a 4% dos homens. O processo de fibrose ocorre na túnica albugínea, uma camada fibrosa que circunda os corpos cavernosos do pênis. A doença causa o aparecimento de uma curvatura no pênis em ereção.

11.8.5 Peptidases no tratamento da doença celíaca

Outras peptidases, além de collagenases, elastases e queratinases, podem apresentar aplicação na indústria farmacêutica. Peptidases capazes de hidrolisar ligações peptídicas adjacentes a unidades de prolina, como as prolil-endopeptidases, têm importância na terapia da diarreia celíaca⁹⁸. A doença celíaca é uma doença causada pela ingestão de proteínas do glúten (trigo, centeio e cevada) e tem diferentes sintomas, como diarreia crônica e distensão abdominal, cuja única opção de tratamento é a exclusão das proteínas do glúten da alimentação. O principal componente tóxico do glúten do trigo é a proteína gliadina, com regiões ricas em prolina e glicina⁹⁹, que

é relativamente resistente à hidrólise por peptidases presentes no trato gastrointestinal e leva a uma resposta inflamatória em indivíduos suscetíveis. As prolil-endopeptidases tornam-se, assim, um agente profilático oral para a doença celíaca.

11.8.6 Aplicações da toxina botulínica

A toxina botulínica do tipo A é uma proteína obtida do crescimento da bactéria anaeróbia *Clostridium botulinum*, responsável pela doença conhecida como botulismo. Nessa patologia, a toxina bloqueia a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular e, como resultado, o músculo perde a capacidade de contração. Para fins médicos, é utilizada uma forma injetável da toxina botulínica purificada; aplicada diretamente nos músculos comprometidos, é um tratamento farmacológico local para a hiperatividade muscular, provocando um relaxamento e bloqueando a atividade motora involuntária. Dessa forma, a toxina botulínica interfere seletivamente na capacidade de contração da musculatura. A dosagem aplicada para fins terapêuticos e estéticos é muito pequena e incapaz de desencadear as reações do envenenamento alimentar do botulismo. Quando sintetizada pela bactéria, a neurotoxina apresenta-se com uma cadeia polipeptídica simples de aproximadamente 150 kDa, cuja ativação ocorre com a clivagem em dois fragmentos polipeptídicos unidos por uma ponte dissulfeto. Essa divisão gera uma cadeia leve, uma metalo-peptidase dependente de zinco, e uma cadeia pesada, esta contendo domínios funcionais, um de ligação a receptores e outro de translocação membranar. A toxina botulínica bloqueia a liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares por um mecanismo que envolve três etapas. A etapa inicial é a ligação da toxina a receptores específicos localizados na membrana pré-sináptica da junção neuromuscular. A segunda etapa envolve a internalização da toxina por endocitose mediada pelo receptor. Contudo, é no citoplasma do neurônio-alvo que ocorre a terceira etapa, a inibição da liberação de acetilcolina, através da atividade peptidásica da cadeia leve, que inativa alguns peptídeos necessários para a liberação das vesículas de acetilcolina¹⁰⁰.

Dentre as indicações da toxina botulínica tipo A estão estrabismo, blefaroespasma (contração involuntária dos músculos do olho), espasmo hemifacial, distonias e espasticidade. A distonia é a contração muscular involuntária em diferentes partes do corpo, e a espasticidade é a contração permanente que leva ao encurtamento de tendões e músculos, também causando dores

e posturas anormais. A toxina botulínica pode ser também utilizada para o tratamento de crianças com problemas musculares. Nesses casos, a toxina permite maior flexibilidade muscular e redução do uso de medicação antiespástica. A toxina botulínica tipo A também é usada no tratamento de incontinência urinária, aplicada diretamente na parede da bexiga, fazendo com que haja um relaxamento temporário da musculatura, um controle da vontade de urinar, e, acima de tudo, uma melhora na qualidade de vida do paciente. Além das indicações terapêuticas, o medicamento é amplamente conhecido no tratamento de linhas faciais hiperclínicas e para o tratamento da hiperhidrose palmar e axilar. A toxina botulínica interfere seletivamente na capacidade de contração da musculatura e, por isso, as linhas de expressão são suavizadas. A marca americana Botox® foi a primeira a ser liberada para uso estético, mas atualmente outras marcas estão disponíveis, como Dysport® e Prosigne®¹⁰¹.

11.8.7 Peptidases como ativadoras de pró-fármacos

As peptidases também podem ser utilizadas na indústria farmacêutica como ativadores de pró-fármacos. Nessa tecnologia, procura-se evitar um dos principais obstáculos ao emprego de quimioterápicos em uma neoplasia: a limitação de dose devido à toxidez do quimioterápico, em função da sua baixa seletividade para células neoplásicas em comparação com as células normais, não neoplásicas. A estratégia denominada ADEPT, sigla em inglês que significa *antibody-directed enzyme prodrug therapy*, implica a administração de um pró-fármaco, molécula antineoplásica em sua forma quimicamente inativa, e sua posterior conversão na forma ativa *in vivo*, exclusivamente nas proximidades do local de ação. A ativação envolve a administração prévia de uma enzima capaz de promover a ativação da droga, e normalmente essa enzima é direcionada para as células tumorais através da associação com um anticorpo específico para os componentes superficiais das células neoplásicas. Dessa forma, a enzima se acumula no local do tumor e só então promove a ativação do fármaco, de modo a minimizar a ação do antineoplásico sobre as células não neoplásicas⁶⁸. Para que estas estratégias terapêuticas sejam bem-sucedidas, a enzima, ou uma homóloga dela, não deve estar presente em tecidos humanos ou, se estiver, deve ser expressa somente em baixas concentrações nos demais tecidos. Essa é uma das razões pelas quais têm sido utilizadas enzimas de origem microbiana.

Entre as enzimas que são empregadas nessa tecnologia, encontra-se a carboxipeptidase G2 (CPG2), uma metalo-peptidase obtida do meio de cultura de *Pseudomonas putida*. A função normal dessa enzima é catalisar a conversão de folato reduzido e não reduzido em ácido pteróico e ácido glutâmico. Fármacos podem ser transformados em pró-fármacos através de uma ligação amida com o substrato da enzima, o ácido glutâmico; na presença de CPG2, a ligação amida é clivada, liberando os fármacos ativos e o ácido glutâmico. Os resultados obtidos em casos de tumor de cólon sugerem que o sistema ADEPT, baseado em CPG2, é uma promissora terapia antineoplásica. No entanto, se uma enzima não humana é utilizada, podem ocorrer reações de hipersensibilidade induzidas por intensa resposta imune e consequente falha na terapia. Para minimizar a imunogenicidade induzida pelo sistema ADEPT, duas estratégias podem ser utilizadas. A primeira consiste na utilização de formas mutantes de enzimas humanas, as quais podem proporcionar menor toxicidade sistêmica que enzimas endógenas e menor imunogenicidade que as não humanas. Uma forma de enzima humana mutante de carboxipeptidase A1 (CPA1), conjugada a um anticorpo com afinidade para células tumorais, foi capaz de ativar um pró-fármaco de metotrexato, que não foi um bom substrato para a enzima endógena CPA126. A outra estratégia consiste no uso de tecnologia DNA recombinante, combinando regiões variáveis da cadeia leve e pesada de anticorpos não humanos, responsáveis pelo reconhecimento do antígeno-alvo, com regiões constantes de anticorpos humanos¹⁰².

11.8.8 Estratégias para o uso crescente de peptidases

Sendo uma área tão promissora, o uso de peptidases pela indústria farmacêutica e de cosmético preconiza a produção de novos fármacos mais específicos e mais individualizados, principalmente na terapia de reposição enzimática e vacinas, além de grandes avanços na área de terapia cosmética antienvhecimento. As dificuldades no uso de peptidases podem ser contornadas por diferentes estratégias de formulação, como a conjugação com polímeros para diminuir a imunogenicidade de enzimas, além da incorporação de enzimas a lipossomos visando diminuir a toxicidade, direcionando o acesso ao órgão-alvo⁶⁷. No entanto, o potencial benefício não é compensatório se o custo de obtenção dessas enzimas for superior aos processos químicos convencionais e se for necessário um maior controle de produção e de purificação final. O crescente conhecimento das doenças e dos processos bioquímicos envolvidos irá possibilitar a produção heteróloga de enzimas

em diferentes modelos celulares, o que permitirá a obtenção de maiores rendimentos com custos mais convenientes⁶⁷.

11.9 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA TÊXTIL

As principais enzimas utilizadas na indústria têxtil são as hidrolases e as oxidoredutases. No grupo das hidrolases, podemos destacar não só as peptidases, como também as amilases, as pectinases, as celulases e as lipases⁴³. A aplicação de peptidases na indústria têxtil ainda é limitada devido à instabilidade térmica e química dessas enzimas, além do alto custo quando comparado aos métodos convencionais^{103,104}.

Ao contrário do tratamento com reagentes químicos, as peptidases podem ser utilizadas para alterar as propriedades das fibras têxteis e remover impurezas de forma menos drástica, reduzindo consideravelmente danos eventuais às fibras do tecido^{9,105}. De forma geral, as peptidases na indústria têxtil apresentam como principais aplicações: (1) a biopurga ou biopreparação, que é a remoção de impurezas proteicas; (2) a resistência ao encolhimento; (3) a desengomagem; e (4) o melhoramento da qualidade do tecido em relação ao seu tingimento e brilho (Tabela 11.10). A maioria dos estudos tem como foco a aplicação de peptidases no acabamento têxtil, como, por exemplo, no processamento de lã e couro e na desengomagem de fibras de seda, melhorando sua textura e aumentando sua qualidade¹⁰⁵.

Tabela 11.10 Peptidases provenientes de micro-organismos utilizadas na indústria têxtil

| NOME COMERCIAL | FONTE | INDÚSTRIA | PROPRIEDADES |
|----------------|-------------------------------|------------------------|--|
| Alcalase | <i>Bacillus licheniformis</i> | Novo Nordisk Novozymes | Desengomagem do fio da seda |
| Esperase | <i>Bacillus lentus</i> | Novo Nordisk Novozymes | Desengomagem do fio da seda |
| NovoBate WB | <i>Bacillus</i> sp. | Novo Nordisk | Tratamento de couro |
| NUE | <i>Bacillus</i> sp. | Novo Nordisk | Calagem do couro (ativa em pH 12 a 13) |
| Primatan | Não especificada | Genencor International | Purga do couro |
| Protin | <i>Bacillus</i> sp. | Amano Pharmaceuticals | Purga do couro, depilação |
| Purafect | <i>Bacillus lentus</i> | Genencor International | Tratamento do couro (imersão alcalina) |
| Thermoase | <i>Bacillus</i> sp. | Amano Pharmaceuticals | Purga do couro, depilação |

Fonte: Adaptado de Ray (2012)⁶, Gupta et al. (2002)⁷ e Kirk et al. (2002)⁴³.

Serina-peptidases pertencentes à família das subtilisinas, geralmente secretadas por diferentes cepas e espécies de *Bacillus*, vêm sendo testadas como alternativa ao tratamento químico também na indústria têxtil⁵. Estudos mostraram que essas peptidases foram capazes de melhorar as propriedades da fibra de lã, uma proteína formada principalmente por queratina. A camada externa da fibra apresenta um aspecto escamoso que é associado à capacidade de feltragem e encolhimento da lã. Assim, o tratamento com peptidases pode aumentar a capacidade de tingimento e de resistência ao encolhimento do tecido^{103,104}. Peptidases alcalinas isoladas de *Bacillus* spp., bem como a papaína, vêm sendo propostas para o tratamento das fibras da seda. Aproximadamente 25% do total do peso seco da seda são compostos por sericina, uma proteína globular amorfa que recobre os filamentos de fibroína, que por sua vez é uma proteína fibrosa majoritária encontrada na fibra da seda. A sericina confere à seda uma textura rugosa, e a peptidase age removendo a goma (sericina) do fio da seda através do processo de desengomagem, tornando a seda mais brilhosa, com textura lisa e com melhor elasticidade¹⁰⁸. O uso de peptidases em combinação com outras enzimas pode também melhorar o processo de lavagem de tecidos de algodão¹⁰⁹. O algodão apresenta aproximadamente 10% de substâncias não celulósicas, incluindo lipídios, pectinas e proteínas. Esses materiais de origem não celulósica formam uma barreira física hidrofóbica, que protege a fibra no ambiente; no entanto, dificultam a capacidade de absorção do tecido durante o processamento têxtil. Dessa forma, para remoção dessas impurezas, a peptidase é adicionada a uma formulação contendo outras enzimas, como celulases, lipases e pectinases⁹. Estudos também têm proposto o tratamento de fibras sintéticas como poliamida (Nylon®) e poliéster com peptidases. As fibras sintéticas possuem um número reduzido de grupos hidrofílicos e, por esse motivo, absorvem pouca água. Dessa forma, a ação de peptidases em associação com outras enzimas, como as lipases, aumenta o caráter hidrofílico e, consequentemente, melhora a absorção de água e afinidade tintorial das fibras sintéticas^{110,111}.

O couro também é utilizado na indústria têxtil. Esse material de origem animal contém proteínas e gorduras que são removidas ao longo de várias etapas do processamento industrial. Dessa forma, peptidases associadas a outras enzimas como lipases são geralmente utilizadas no processo, antes do curtimento do couro, em etapas denominadas remolho, depilação e purga¹¹². Na etapa de remolho, peptidases alcalinas são utilizadas para remoção de proteínas não colagenosas, facilitando a absorção da água pelo couro e diminuindo o tempo de remolho quando comparado aos métodos

convencionais. No processo de depilação ocorre a remoção do pelo e da epiderme, que são formados por proteínas residuais não fibrilares. As peptidases com atividades queratinolíticas e elastinolíticas vêm sendo empregadas neste processo, permitindo a hidrólise seletiva da proteína no folículo piloso sem afetar a resistência à tração do couro³⁰. A aplicação de peptidases específicas na depilação do couro pode reduzir significativamente a quantidade de sulfeto de sódio necessária nesse processo, melhorando a qualidade do couro e minimizando, assim, a poluição ambiental⁵. As peptidases também são utilizadas no processo de purga, relaxando as fibras de colágeno e tornando o couro mais macio, influenciando, por conseguinte, a qualidade do processo de curtimento e acabamento desse material.

11.10 USO DE PEPTIDASES EM OUTROS SETORES INDUSTRIAIS

11.10.1 Gestão de resíduos industriais e domésticos

O uso da peptidase alcalina na gestão de resíduos de várias indústrias de processamento de alimentos e atividades domésticas abriu uma nova era na utilização de peptidases na gestão de resíduos. Dalev¹¹³ utilizou a peptidase alcalina secretada por *Bacillus subtilis* no intuito de degradar penas provenientes dos resíduos da indústria avícola. As penas constituem aproximadamente 5% do peso do frango e são resíduos recalcitrantes; no entanto, são uma fonte rica em proteínas que podem ser usadas na composição de rações animais (exemplo: gado, frango e peixe), desde que sua estrutura rígida de queratina seja degradada. Além disso, uma formulação contendo as peptidases produzidas por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Streptomyces* sp. e um agente redutor (tioglicolato) foi patenteada pela Genex, com a capacidade de degradar eficientemente fios de cabelo. Esse produto comercial tem como finalidade ajudar a limpeza de tubos entupidos com depósitos de cabelo¹¹⁴.

11.10.2 Indústria fotográfica

Peptidases alcalinas desempenham um papel crucial no bioprocessamento de filmes de raios X e filmes fotográficos, com o propósito de recuperar a prata impregnada nesses substratos. Esses filmes contêm uma camada de

gelatina suplementada com aproximadamente 1,5% a 2,0% de seu peso em prata. A reciclagem desses filmes pode gerar uma fonte de prata para uma variedade de fins. Convencionalmente, essa prata é recuperada através da queima dos filmes, o que causa poluição ambiental indesejável. Além disso, a película de base de poliéster não pode ser recuperada usando esse método. A hidrólise enzimática da gelatina não só ajuda a extrair a prata, mas também permite a reciclagem da película de poliéster. A peptidase alcalina de *Bacillus subtilis* foi eficiente em desfazer a camada de gelatina após 30 minutos a 50 °C a 60 °C, liberando a prata¹¹⁵ (Tabela 11.11).

11.10.3 Componentes ativos de soluções de limpeza

As peptidases são componentes úteis e importantes em soluções de limpeza de lentes de contato, dentaduras, membranas filtrantes e materiais cirúrgicos²⁷ (Tabela 11.11).

Tabela 11.11 Peptidases provenientes de micro-organismos utilizadas em diferentes processos

| NOME COMERCIAL | FONTE | INDÚSTRIA | PROPRIEDADES |
|----------------|-------------------------------|-----------------------|--|
| HT-proteolytic | <i>Bacillus subtilis</i> | Solvay Enzymes | Limpeza de resíduos fotográficos |
| Novozyme 243 | <i>Bacillus licheniformis</i> | Novo Nordisk | Limpeza de dentaduras |
| Novozyme 471MP | Não especificada | Novo Nordisk | Hidrólise de gelatina em filmes fotográficos |
| Protin | <i>Bacillus</i> sp. | Amano Pharmaceuticals | Recuperação de prata |
| Thermoase | <i>Bacillus</i> sp. | Amano Pharmaceuticals | Recuperação de prata |

Fonte: Adaptado de Jisha et al. (2013)⁸ e Yoshioka et al. (2007)⁹¹.

11.10.4 Peptidases em pesquisa

As peptidases podem ser usadas na rotina laboratorial em diferentes metodologias experimentais, como, por exemplo, no preparo de culturas de células animais aderentes (tripsina e collagenase), extração e purificação de material genético, DNA e RNA (proteinase K, pronase) e digestão de proteínas para análise proteômica (tripsina)².

11.11 TÉCNICA PASSO A PASSO PARA A DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

11.11.1 Substratos sintéticos para a detecção de atividade proteolítica

O uso de substratos peptídicos sintéticos tem sido amplamente utilizado para o monitoramento da atividade catalítica de peptidases. A identificação de um substrato adequado é o primeiro passo para o desenvolvimento de um ensaio para monitorar sua atividade. Dentre os substratos sintéticos que permitem o monitoramento da reação enzimática de forma contínua em aparelhos de espectrometria estão os substratos fluorogênicos e cromogênicos.

Os substratos fluorogênicos simples possuem um fluoróforo que se encontra ligado a um pequeno peptídeo que emite fluorescência mediante a clivagem do mesmo por uma peptidase (Figura 11.2). Esses substratos contêm aminas aromáticas como a 7-amino-4-metilcumarina (AMC) ou 4-metil-7-cumarilamida (NH-Mec), que estão conjugadas a peptídeos pequenos que conferem especificidade à reação. É a clivagem da ligação amida por peptidases que leva a um aumento da fluorescência. O grupo fluorescente ocupa a posição S1' das peptidases e sofre uma modificação das suas características de fluorescência na acilação do aminoácido.

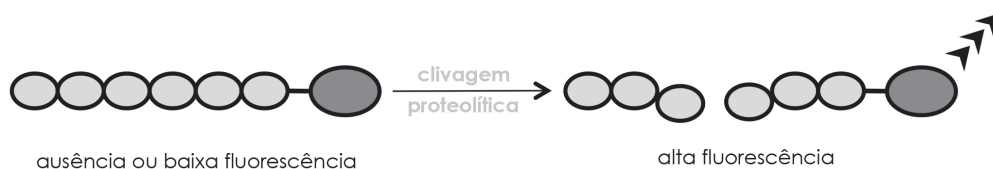


Figura 11.2 Grupos fluorescentes são adicionados ao substrato peptídico para gerar substratos para ensaios baseados em fluorescência. O substrato mais simples é sintetizado pela adição de uma classe de cumarina à sequência peptídica linear. A hidrólise do substrato por uma peptidase leva à emissão da fluorescência.

11.11.1.1 Fatores que influenciam a dosagem de atividade proteolítica utilizando substratos peptídicos

A avaliação da atividade deve ser realizada sob condições ótimas de pH, temperatura, enzima e substrato, as quais irão variar de acordo com a enzima

a ser estudada. Dessa forma, para uma análise satisfatória, é necessário conhecimento sobre a enzima estudada, como o pH ótimo de atuação, a temperatura na qual a enzima encontra-se estável e com alta atividade e a necessidade da adição de cofatores, como íons, por exemplo.

Temperatura

A temperatura é um dos fatores cruciais para a atividade enzimática. Nas reações catalisadas por enzimas, a velocidade é acelerada pelo aumento da temperatura até atingir uma temperatura ótima, na qual a enzima opera com a máxima eficiência. O aumento de temperatura provoca maior agitação intermolecular, e, conseqüentemente, maior probabilidade de as moléculas se chocarem para reagir. Entretanto, um aumento exagerado na temperatura leva a uma redução na atividade, uma vez que a agitação das moléculas se torna tão intensa que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se rompem, ou seja, desnaturam-se. Por outro lado, as enzimas ficam inativas quando submetidas a baixas temperaturas, devido à falta de energia de ativação para provocar o choque entre as moléculas enzimáticas e as moléculas do substrato, levando a uma redução na atividade enzimática.

pH

O grau de acidez do meio, ou pH, é outro fator que influencia diretamente uma reação enzimática. Cada enzima possui uma faixa de pH ótima na qual a atividade catalítica é máxima. A influência do pH está diretamente relacionada com o estado de ionização das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da proteína e que são essenciais à catálise. Além disso, eles atuam em interações responsáveis pela manutenção da estrutura proteica. Dessa forma, a adição ou remoção de um próton pode desestabilizar a conformação da enzima, acarretando, como consequência, uma redução na sua capacidade catalítica.

Concentração da enzima

A velocidade de uma reação também será afetada pela quantidade de enzima disponível no meio. Dessa forma, a velocidade de clivagem do

substrato é proporcional à concentração da enzima presente no meio reacional.

Concentração do substrato

A velocidade máxima de uma reação também está diretamente relacionada com a concentração do substrato presente no meio, e a velocidade máxima apenas será atingida quando essa concentração for extremamente alta. Quando aumentamos a concentração do substrato, a enzima presente estará saturada, ou seja, todos os seus sítios ativos estarão ocupados por moléculas do substrato ou do produto. A partir desse momento, qualquer aumento na concentração do substrato não afetará a velocidade da reação.

11.11.1.2 Protocolo para detecção de atividade enzimática utilizando substrato peptídico

Obtenção do extrato celular

- 1) Contar e coletar o equivalente a 10^8 células microbianas.
- 2) Ressuspender as células em tampão com pH adequado para a enzima estudada, contendo o detergente CHAPS a 1%.
- 3) Métodos de lise:
 - 3.1) Adicionar pérolas de vidro às amostras e lisar as células realizando ciclos (de 30 segundos cada) de agitação e congelamento.
 - 3.2) Método congelamento/descongelamento: colocar as amostras durante 3 minutos no nitrogênio líquido alternando com descongelamento no banho-maria.
 - 3.3) Vórtex: submeter as amostras 30 segundos ao vórtex, alternando com 5 minutos de banho de gelo.
- 4) Após a lise, as amostras devem ser centrifugadas a $16.000\times g$ durante 20 minutos.
- 5) O sobrenadante deve ser coletado e usado para medição da atividade enzimática.

Obtenção do sobrenadante de cultivo

- 1) Transferir o meio de cultura com crescimento microbiano para tubos de centrífuga.
- 2) Centrifugar o meio de cultivo.
- 3) Separar o sedimento celular do sobrenadante.
- 4) Filtrar o sobrenadante para remover eventuais células.
- 5) Concentrar o sobrenadante (exemplo: Centricon®, Amicon®, polietilenoglicol).
- 6) O sobrenadante concentrado livre de células será utilizado para detecção de peptidases extracelulares.

Dosagem de atividade proteolítica

- 1) Em uma placa de 96 poços, misturar ao extrato celular e/ou ao sobrenadante o substrato peptídico (cromogênico ou fluorogênico) e o tampão para a atividade (no pH ideal da atividade proteolítica).
- 2) Incubar a mistura reacional à temperatura ótima da peptidase e detectar a clivagem do substrato ao longo do tempo através de espectrofotômetro (substratos cromogênicos) ou fluorímetro (substratos fluorogênicos).

11.11.2 Detecção de atividade proteolítica através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)– Zimografia

A eletroforese é um fenômeno observado quando uma partícula carregada migra sob a influência de um campo elétrico. Muitas das substâncias biologicamente importantes, como os aminoácidos, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos, apresentam grupos ionizáveis e podem, quando em solução, existir como cátions e ânions. As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, em vez de em solução livre, por dois motivos: (1) o gel suprime correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura, requisito fundamental para uma separação eficaz; e (2) o gel age como uma peneira molecular que potencializa a separação. As moléculas que são menores em relação aos poros do gel movem-se com maior facilidade através deles, ao passo que as moléculas muito maiores que os poros são

quase imóveis. As moléculas de tamanho intermediário movem-se através do gel com vários graus de facilidade.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi primeiramente descrita em 1970, e hoje é uma das técnicas mais amplamente difundidas em diferentes campos das ciências biológicas, sendo usada principalmente para a separação de proteínas e ácidos nucleicos de baixa massa molecular. Os géis de poliacrilamida são meios de sustentação escolhidos para a eletroforese porque são quimicamente inertes, sendo formados praticamente pela polimerização de moléculas de acrilamida e *N,N*-metileno-bisacrilamida, mais conhecida como bisacrilamida, agente responsável pela formação de ligações cruzadas entre as moléculas de acrilamida (para tal, necessita-se ainda da presença de um catalisador para a reação, o persulfato de amônio, e de um iniciador da polimerização, o tetrametiletenodiamina – TEMED) (Figura 11.3). A migração das proteínas está diretamente relacionada com o tamanho dos poros formados no interior do gel. O tamanho desses poros é um reflexo da concentração de acrilamida e bisacrilamida. Assim sendo, elevadas concentrações dessas substâncias vão resultar em um gel de poliacrilamida com poros menores e, portanto, dotado de melhor capacidade de separar proteínas com menor massa molecular. O gel de poliacrilamida é dividido em duas partes: gel de separação (do inglês, *running gel*) e gel de empacotamento (do inglês, *stacking gel*) (Figura 11.3). O gel de empacotamento é feito geralmente com uma baixa concentração de poliacrilamida, possuindo poros maiores, e tem como função agrupar as proteínas antes que estas entrem no gel de separação, melhorando a resolução das proteínas presentes em uma amostra. O percentual de poliacrilamida do gel de separação deve ser adaptado à faixa de tamanho das proteínas presentes na amostra, melhorando a resolução da separação, como observado na Tabela 11.12.

Tabela 11.12 Faixa de resolução do SDS-PAGE

| PORCENTAGEM DO GEL DE POLIACRILAMIDA | FAIXA DE MASSA MOLECULAR (KDA)* |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| 7 | 50 a 500 |
| 10 | 15 a 300 |
| 12 | 10 a 200 |
| 15 | 10 a 45 |
| 20 | 5 a 40 |

* kDa, kiloDalton

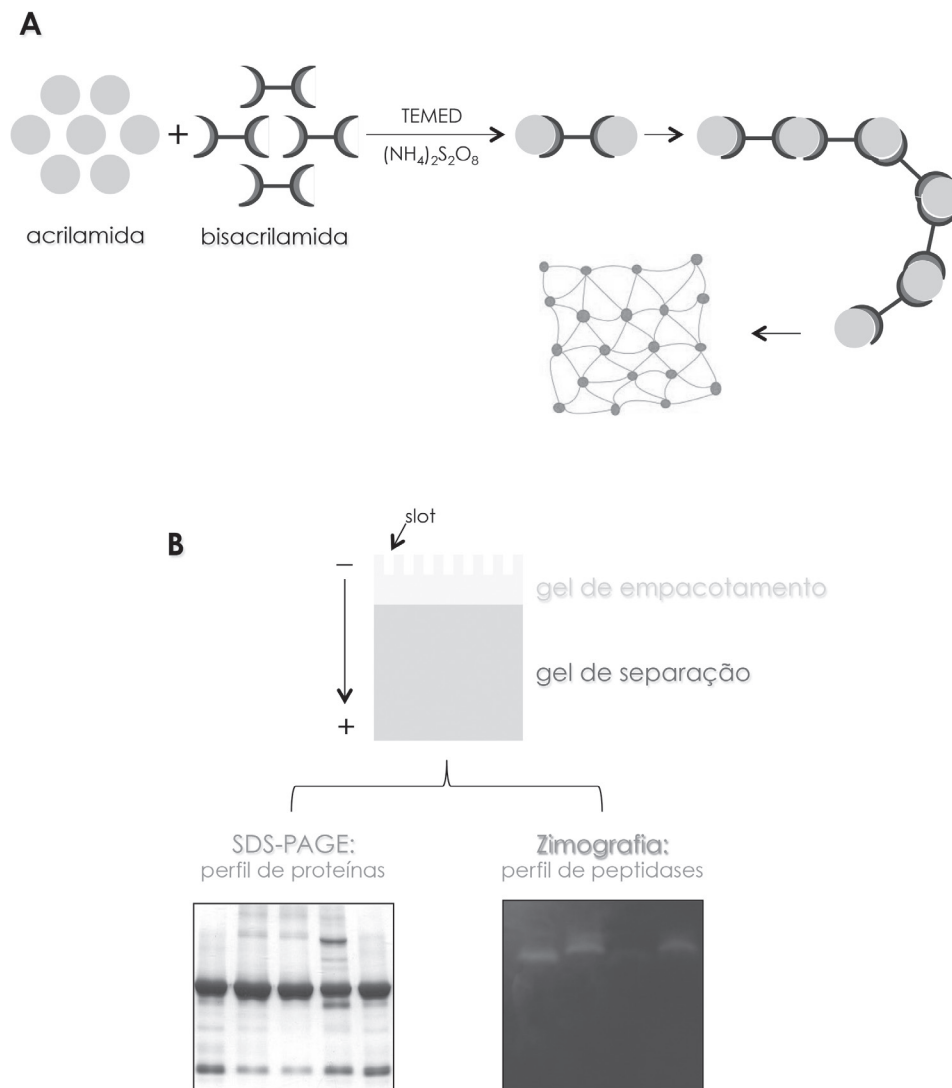


Figura 11.3 (A) Reação entre acrilamida e bisacrilamida na presença de persulfato de amônio e TEMED para a formação do gel de poliacrilamida. (B) Esquema de um SDS-PAGE destacando a presença de duas regiões: gel de empacotamento (com os *slots*, local de adição da amostra a ser analisada) e gel de separação. Os polos negativo e positivo são mostrados à esquerda. Na parte inferior da figura (B), exemplo de géis evidenciando (i) a separação de proteínas de uma amostra (gel à esquerda) e (ii) o perfil de peptidases (gel à direita).

A adição do detergente iônico dodecil sulfato de sódio à eletroforese é comum, sendo essa técnica conhecida como SDS-PAGE. O SDS é um detergente capaz de desnaturar as proteínas, pois liga-se a regiões hidrofóbicas

das moléculas de proteínas causando seu desdobramento, o que resulta na perda de sua estrutura terciária e secundária e consequente linearização. Cada molécula de proteína se liga a um grande número de moléculas de SDS, carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo quando uma tensão é aplicada. A relação quantidade de SDS (ou carga negativa) é proporcional ao tamanho da molécula proteica. Além disso, um agente redutor, como, por exemplo, o β -mercaptoetanol, é geralmente adicionado para quebrar ligações dissulfeto presentes nas proteínas, de tal forma que cada constituinte polipeptídico de uma molécula, formada por várias subunidades, possa ser analisado separadamente. Sendo assim, no SDS-PAGE a taxa de migração baseia-se no tamanho da proteína, com moléculas menores migrando mais rapidamente pelo gel em direção ao eletrodo positivo, afastando-se das proteínas maiores, que tem maior dificuldade em atravessar a malha do gel ao longo da corrida. Como resultado, uma mistura complexa de proteínas é fracionada em uma série de diferentes bandas de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molecular (Figura 11.3).

A presença de peptidases em uma amostra também pode ser avaliada através dessa técnica, conhecida como zimografia, sendo necessária a incorporação de um substrato proteico ao gel de separação. Um dos substratos mais utilizados nesse tipo de ensaio é a gelatina, geralmente a uma concentração de 0,1%, porém concentrações variando de 0,1% a 0,5% também podem ser utilizadas. Outros substratos podem ser utilizados, como substrato proteico incorporado ao gel dependendo do propósito a ser analisado, por exemplo, caseína, albumina, colágeno, mucina, dentre outras. As proteínas são desnaturadas pelo SDS, porém não são reduzidas com β -mercaptoetanol. Após a corrida eletroforética, estas são renaturadas mediante a utilização de um detergente não iônico, como o Triton X-100. Em seguida, o gel é incubado em um tampão apropriado, permitindo, assim, a degradação do substrato proteico na região em que se encontra a peptidase (Figura 11.3). A atividade proteolítica é evidenciada através da coloração do gel com uma solução de Amido Black ou Coomassie Blue em ácido acético, metanol e água destilada. Finalmente, o gel pode ser descorado com solução de ácido acético/metanol, resultando em áreas claras que indicam a presença de hidrólise da proteína incorporada ao gel.

Materiais necessários

- Cuba de eletroforese
- Fonte
- Placas de vidro
- Espaçadores
- Estrutura de montagem das placas
- Moldura para a confecção dos *slots* (pente)

Reagentes

- Solução de poliacrilamida a 30% (29,2 g de acrilamida + 0,8 g de bisacrilamida em 100 mL de água destilada. Filtrar em papel Whatman nº 1. Manter a solução em recipiente escuro, protegido da luz, por no máximo 30 dias. Substância neurotóxica e cancerígena, portanto, durante a pesagem deve-se usar luvas e máscara).
- Solução de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (18,15 g de Tris-base em 100 mL de água destilada. Ajustar o pH a 8,8 com HCl 6 N. A solução deve ser conservada na geladeira).
- Solução de Tris-HCl a 0,5 M, pH 6,8 (6 g de Tris-base em 100 mL de água destilada. Ajustar o pH a 6,8 com HCl 6 N. A solução deve ser conservada na geladeira).
- Solução de gelatina 0,1% (1 g de gelatina em 10 mL de água destilada).
- Solução de SDS a 10% (10 g de SDS em 100 mL de água destilada. Manter à temperatura ambiente).
- Solução de persulfato de amônio (APS) a 10% (0,1 g em 1 mL de água destilada. Conservar no congelador).
- TEMED (utilizar direto do frasco mãe).
- Tampão de corrida 5× (9 g de Tris-base, 43,2 g de glicina, 3 g de SDS e 600 mL de água destilada. Ajustar pH para 8,3 com HCl 6 N. Manter a solução estoque em geladeira. A solução deve ser utilizada diluída a 1×, a fim de realizar a corrida eletroforética).
- Tampão de amostra 4× (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,002%. Conservar no congelador).
- Solução de Triton X-100 a 2,5% (2,5 g de Triton X-100 em 100 mL de água. Conservar na geladeira).
- Solução de azul de Coomassie brilhante R-250 (2,5 g em 400 mL de água destilada, 500 mL de metanol e 100 mL de ácido acético. Manter à temperatura ambiente).

- Solução descorante (250 mL de metanol, 100 mL de ácido acético e 650 mL de água destilada. Manter à temperatura ambiente).

Preparo do gel e corrida eletroforética

- 1) Após montagem das placas no suporte de eletroforese, adicionar água a fim de detectar possíveis regiões de vazamento.
- 2) A concentração dos reagentes vai variar de acordo com o porcentual de poliacrilamida a ser utilizado. A Tabela 11.13 apresenta a confecção de géis em diferentes porcentuais de poliacrilamida.
- 3) Após o preparo do gel, adicionar a solução ao espaço entre as placas de vidro utilizando uma pipeta Pasteur, deixando espaço suficiente para o gel de empacotamento e colocação do pente.
- 4) Recomenda-se adicionar cuidadosamente água destilada na parte superior do gel a fim de remover possíveis bolhas formadas.
- 5) Após a polimerização do gel de separação, a solução do gel de empacotamento deve ser adicionada, e o pente imediatamente colocado.
- 6) Após a remoção dos pentes presentes nos géis polimerizados, adicionar o tampão de corrida na parte superior dos géis completando todos os espaços, bem como no reservatório na parte inferior da cuba eletroforética, certificando-se de que a parte inferior do gel está em contato com o tampão.
- 7) O tampão de amostra deve ser adicionado às amostras de proteínas ajustadas para a concentração desejada e, então, adicionadas nos espaços criados pelos pentes (chamados de *slots*), reservando o primeiro poço para o padrão de massa molecular.
- 8) A corrida deve ser realizada a 4 °C, a uma corrente constante de 200 Volts e 40 mA.
- 9) Após a corrida eletroforética, os géis devem ser incubados por 1 hora à temperatura ambiente na presença de Triton X100 2,5%, sob agitação constante.
- 10) Em seguida, lavar os géis com água destilada várias vezes, para a retirada do Triton X-100, e adicionar o tampão de digestão apropriado com o pH que deseja ser utilizado para a reação enzimática.
- 11) Os géis devem então ser incubados por até 48 horas na temperatura ótima da atividade enzimática.
- 12) Com o intuito de visualizar a hidrólise da gelatina pelas enzimas proteolíticas presentes na amostra, incubar os géis por 16 horas na presença do corante azul de Coomassie R-250, descorando-os logo em seguida

utilizando a solução descorante, evidenciando-se assim a presença de halos claros em um fundo azul.

Tabela 11.13 Composição do SDS-PAGE

| SOLUÇÕES | GEL DE SEPARAÇÃO 7,5% | GEL DE SEPARAÇÃO 10% | GEL DE SEPARAÇÃO 12% | GEL DE SEPARAÇÃO 15% | GEL DE EMPACOTAMENTO 4% |
|----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| Poliacrilamida | 2,5 mL | 3,2 mL | 4,0 mL | 5,0 mL | 1,33 mL |
| Tris pH 8,8 | 2,5 mL | 2,5 mL | 2,5 mL | 2,5 mL | – |
| Tris pH 6,8 | – | – | – | – | 2,5 mL |
| Água destilada | 3,84 mL | 3,28 mL | 2,34 mL | 1,34 mL | 6,1 mL |
| Gelatina 1% | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | – |
| SDS 10% | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| APS 10%* | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 50 µL |
| TEMED* | 5 µL | 5 µL | 5 µL | 5 µL | 10 µL |

* Uma vez que o APS e o TEMED são os agentes catalisadores da polimerização do gel, devem ser os últimos a serem adicionados ao gel de separação. O gel de empacotamento deve ser preparado após a polimerização do gel de separação.

Diferentes parâmetros podem ser avaliados na zimografia, tais como: número de bandas com atividade proteolítica, intensidade da atividade enzimática e estimativa de massa molecular. Em adição, pode-se avaliar o pH ótimo de atividade (variando-se o pH do tampão de digestão enzimática), a temperatura ótima de atividade (variando-se a temperatura de incubação do gel), tempo de proteólise (variando-se o tempo de incubação no tampão de digestão), classe proteolítica (incubando-se o gel na ausência e na presença de inibidores de diferentes classes de peptidases), requerimento de íons (incubando-se o gel na ausência e na presença de diferentes cátions ou ânions) e capacidade de degradar diferentes substratos proteicos (incorporando-se ao gel diferentes proteínas, tais como caseína, albumina, fibronec-tina, laminina, mucina, colágeno, dentre outras). A Figura 11.4 sugere um fluxograma para essa análise multifatorial da atividade proteolítica através de zimografia.

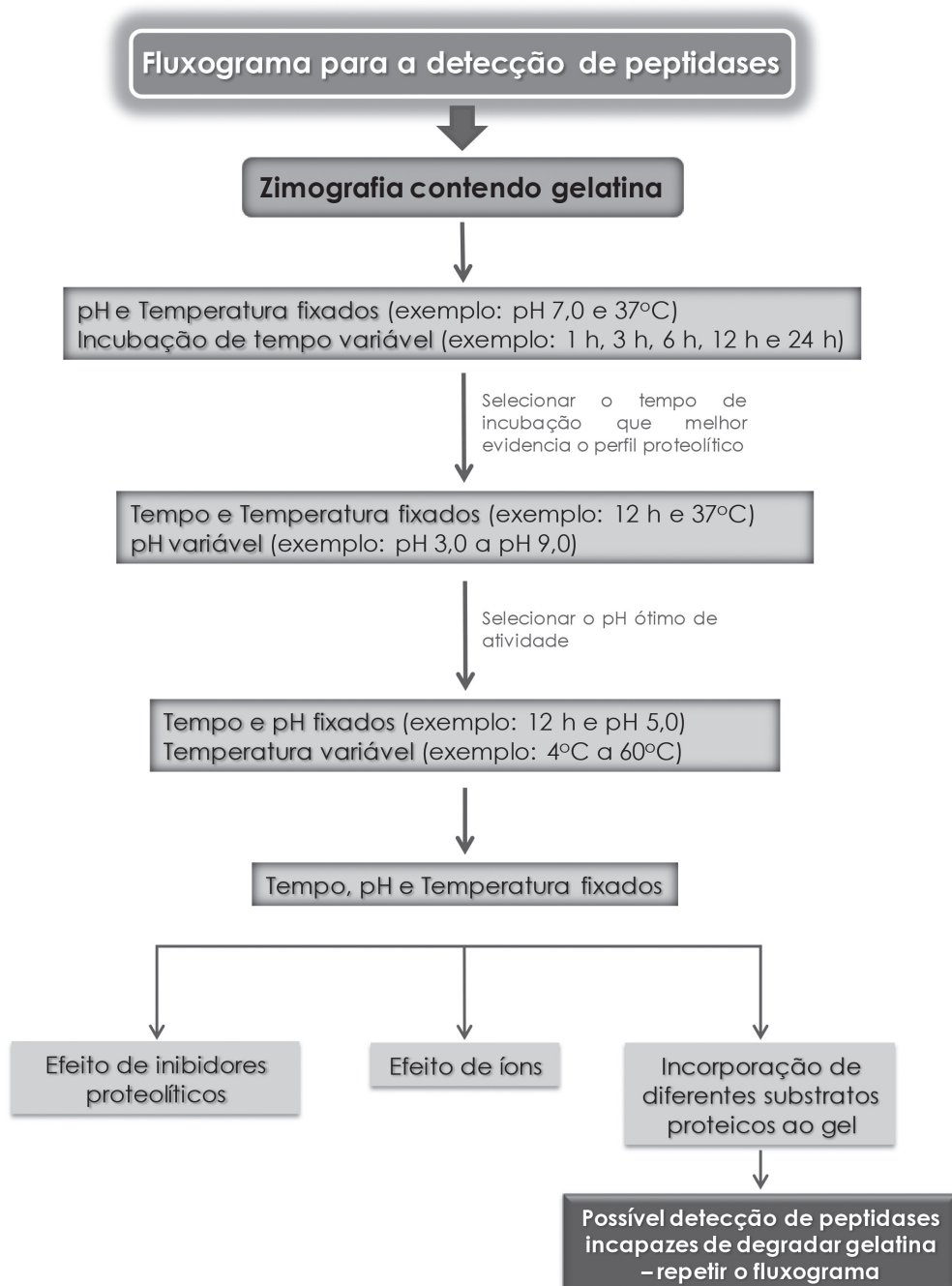


Figura 11.4 Fluxograma para a detecção de peptidases através de zimografia.

11.12 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As peptidases ocupam lugar de destaque no cenário mundial, pois são responsáveis por reações cruciais ao metabolismo celular, além de apresentarem propriedades biotecnológicas adequadas para o uso em diferentes processos industriais. Uma visão econômica global indica que a relação entre a demanda mundial de peptidases e o PIB mundial vem aumentando de forma significativa, e a demanda por essa classe de enzimas tem previsão de avançar de 5% a 6% ao ano até 2015.¹⁸⁻²⁰ Vislumbrando o sucesso comercial dessa classe de enzimas, pesquisadores já começaram a direcionar suas investigações para a descoberta e a engenharia de novas peptidases, que possam atender à imensa demanda comercial global. No futuro próximo, a engenharia de proteínas irá oferecer possibilidades de geração de peptidases com funções inteiramente novas. Associado a isso, o avanço acelerado de técnicas moleculares cada vez mais robustas e precisas em relação aos estudos de diversidade microbiana vem desvendando de forma surpreendente a imensidão dessa biodiversidade como possível fonte de novos biocatalisadores. A biodiversidade representa, sem dúvida, um recurso valioso para as inovações biotecnológicas e desempenha um papel importante na busca de melhores cepas de micro-organismos para utilização nos mais variados processos industriais, tornando-os mais rápidos, eficazes, econômicos e limpos do ponto de vista ecológico.

REFERÊNCIAS

1. López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*. 2008;283:30433-7.
2. Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv*. 1999;17:561-94.
3. Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL. Commercial proteases: present and future. *FEBS Lett*. 2013;587:1155-63.
4. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:597-635.
5. Ray A. Protease enzyme-potential industrial scope. *Int J Tech*. 2012;2:1-4.
6. Ward OP, Rao MB, Kulkarni A. Proteases, Production. In: *Applied Microbiology: Industrial*. New York: Springer; 2009. p. 495-511.
7. Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline peptidases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;59:15-32.
8. Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, Priji P, Josh MS, Benjamin S. Versatility of microbial proteases. *Adv Enzyme Res*. 2013;1:39-51.
9. Mojsov K. Enzyme scouring of cotton fabrics: a review. *Int J Market Technol*. 2012;2:256-75.
10. Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA. The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol*. 2001;134:95-102.
11. Barrett AJ, Tolle DP, Rawlings ND. Managing peptidases in a post genomic era. *Biol Chem*. 2003;384:873-882.
12. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:D343-50.
13. Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem*. 2005;1:71-104.
14. Craik C, Page M, Madison E. Proteases as therapeutics. *Biochem J*. 2011;435:1-17.
15. Santos ALS, Sodré CL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Proteolytic inhibitors: implications on microorganisms development, virulence and pathogenesis. *Curr Med Chem*. 2013;20:3035-40.
16. Dash A, Kulkarni A, Dunn B, Rao M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2003;38:89-119.
17. Santos ALS, Braga-Silva LA. Aspartic protease inhibitors: effective drugs against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mini Rev Med Chem*. 2013;13:155-62.
18. World Enzyme – Industry Market Research, The Freedonia Group, Cleveland, OH, USA, pp. 338 (January 2014).
19. World Enzymes – Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders. The Freedonia Group, Cleveland, OH, USA, pp. 338 (January 2014).

20. Enzyme – Industry Market Research, The Freedonia Group, Cleveland, OH, USA, pp. 309 (May 2015).
21. Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: a review. *Bioresour Technol.* 1998;64:175-83.
22. Outtrup H, Boyce COL. Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty CT, Kelly K, editors. *Microb enz and biotechnol.* London: Elsevier; 1990. p. 227-54.
23. Birschbach P, Fish N, Henderson W, Willrett D. Enzymes: tools for creating healthier and safer foods. *Food Technology.* 2004;58:20-6.
24. Neklyudov AD, Ivankin AN, Berdutina AV. Properties and uses of protein hydrolysates (review). *Appl Biochem Microbiol.* 2000;36:452-9.
25. Ward OP. Proteolytic enzymes. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive biotechnology, the practice of biotechnology: current commodity products.* Oxford: Pergamon Press; 1985. p. 789-818.
26. Dressler D. Botulinum toxin drugs: future developments. *J Neural Transm.* 2008;115:575-7.
27. Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline protease from *Spilosomaobliqua*: potential applications in bioformulation. *Biotechnol Appl Biochem.* 2000;31:85-9.
28. Sjodahl J, Emmer A, Vincent J, Roeraade J. Characterization of proteinases from Antarctic krill(*Euphausiasuperba*). *Protein Expr Purif.* 2002;26:153-61.
29. Andersen L, inventor. Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. United Statespatent.US5834299 A; 1998 Nov 10.
30. Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70:21-33.
31. Varela H, Ferrari MD, Belobradjic L, Vazquez A, Loperena ML. Skin unhairing proteases of *Bacillus subtilis*: production and partial characterization. *Biotechnol Lett.* 1997;19:755-8.
32. Valdirene NM, Roberto NS. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos.* 2009;3:9-23.
33. Melo LCP. Química verde no Brasil: 2010-2030 – Edição revista e atualizada. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos; 2010.
34. Liese A, Seelbach K, Wandrey C. *Industrial biotransformations.* Weinheim: Willey-VCH; 2006.
35. Castilho LR, Polato CMS, Baruque EA, Sant’anna JrGL, Freire DMG. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem Eng J.* 2000;4:239-47.
36. Joo HS, Chang CS. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Proc Biochem.* 2005;40:1263-70.

37. Paulillo LF, Vian CEF, Shikida PFA, Mello FT. Álcool combustível e biodiesel no Brasil: quo vadis? *Rev Econ Sociol Rural*. 2007;45:531-65.
38. Pandey A, Soccol CR. Bioconversion of biomass: a case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid-state fermentation. *Braz Arch Biol Technol*. 1998;41:379-90.
39. Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. Biotechnological potential of agro industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*. 2000;74:69-80.
40. Godfrey T, West S. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial Enzymology*. 2nd ed. London: Macmillan Press; 1996. p. 1-8.
41. Maurer KH. Detergent peptidases. *Curr Opin Biotechnol*. 2004;15:330-4.
42. Showell MS. Enzymes, detergent. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis And Bioseparation*. New York: Wiley & Sons; 1999. p. 958-71.
43. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotech*. 2002;13:345-51.
44. Kumar D, Savitri N, Thakur N, Verma R, Bhalla TC. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res J Microbiol*. 2008;3:661-72.
45. Sinha R, Khare SK. Isolation of a halophilic *Virgibacillus* sp. Emb13: characterization of its protease for detergent application. *Indian J Biotechnol*. 2012;11:416-26.
46. Durham DR. Utility of subtilisin GX as a detergent additive. *J Appl Bacteriol*. 1987;63:381-6.
47. Kitayama M, inventor. New low-temperature alkaline protease. Japanese patent. JP4271781; 1992.
48. Masse FWJL, Tilburg R. The benefit of detergent enzymes under changing washing conditions. *J Am Oil Chem Soc*. 1983;60:1672-5.
49. Nielsen MH, Jepsen SJ, Outtrup H. Enzymes for low temperature washing. *J Am Oil Chem Soc*. 1981;58:644-9.
50. Bech LM, Branner S, Breddam K, Groen H, inventors. Oxidation stable detergent enzymes. United States patent. US5208158A; 1993.
51. Castro HF, Mendes AA, Santos JC. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*. 2004;27:146-56.
52. Gupta R, Gupta K, Saxena RK, Khan S. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett*. 1999;21:135-8.
53. Hasan AKMQ, Tamiya E, inventors. Cold-active protease cp70. Patent. WO 9727313; 1997.
54. Kumar CG, Malik K, Tiwari MP. Novel enzyme-based detergents: an Indian perspective. *Curr Sci*. 1998;75:1312-8.
55. Wolff AM, Showell MS, Venegas MG, Barnett BL, Wertz WC. Laundry performance of subtilisin proteases. In: Bott R, Betzel C, editors. *Subtilisin enzymes: practical protein engineering*. New York: Plenum Press; 1996. p. 113-20.

56. Farell Jr. HM, Malin EL, Brown EM, Qi PX. Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2006;11:135-47.
57. Ruiz DM, Lannuci NB, Cascone O, De Castro RE. Peptide synthesis catalysed by a haloalkaliphilic serine protease from the archaeon *Natrialba magadii* (Nep). *Let Appl Microbiol.* 2010;51:691-6.
58. Regil R, Sandoval G. Biocatalysis for biobased chemicals. *Biomolecules.* 2013;3:812-47.
59. Guzmán F, Barberis S, Illanes A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron J Biotechnol.* 2007;10:279-314.
60. Morihara K, Oka T, Tsuzuki H, Tochino Y, Kanaya T. *Achromobacter* protease I-catalyzed conversion of porcine insulin into human insulin. *Biochem Biophys Res Comm.* 1980;92:396-402.
61. Kumar D, Bhalla TC. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;68:726-36.
62. Gupta A, Khare K. Enzymes from solvent-tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Crit Rev Biotechnol.* 2009;29:44-54.
63. Illanes A, Cauerhff A, Wilson L, Castro GR. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour Technol.* 2012;115:48-57.
64. Sá-Pereira P, Duarte JC, Ferrara MA, Lacerda PSB, Alves FC. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo MS. *Enzimas em Biotecnologia.* Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2008. p. 433-62.
65. Zimmer KR, Borré GL, Trentin DS, Woicickoski C, Frasson AP, Graeff AA, Gomes P, Macedo AJ. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato.* 2009;10:123-37.
66. Onken JE, Brazer SR. Clinical trials. How should they be designed? *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 1994;4:423-34.
67. Cruz MEM, Martins MB, Corvo ML, Gaspar MM, Oliveira EMM, Ferrara MA. Enzimas em medicamentos e diagnóstico. In: Bon EPS, Ferrara MA, Carmo ML. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado.* Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2008. p. 307-31.
68. Santos EP, Velasco MVR, Villa ALV, Simões SI. Enzimas na indústria de cosméticos. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo MS. *Enzimas em Biotecnologia.* Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2008. p. 333-48.
69. Onken JE, Greer PK, Calingaert B, Hale LP. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. *Clin Immunol.* 2008;126:345-52.
70. Bhagat S, Agarwal M, Roy V. Serratiopeptidase: a systematic review of the existing evidence. *Int J Surg.* 2013;11:209-17.

71. Lopes MC, Mascarini RC, da Silva BM, Flório FM, Basting RT. Effect of a papain-based gel for chemomechanical caries removal on dentin shear bond strength. *J Dent Child*. 2007;74:93-7.
72. Balami JS, Chen R, Sutherland BA, Buchan AM. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013;12:145-54.
73. Bansal S, Sangha KS, Khatri P. Drug treatment of acute ischemic stroke. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2013;13:57-69.
74. Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, Hiratani H. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol*. 1990;84:139-43.
75. Yagmurlu A, Barlas M, Gursel I, Gokcora IH. Reduction of surgery-induced peritoneal adhesions by continuous release of streptokinase from a drug delivery system. *Eur Surg Res*. 2003;35:46-9.
76. Bartosh NS, Tomlin T, Cable C, Halka K. Newly diagnosed congenital factor VII deficiency and utilization of recombinant activated factor VII (NovoSeven®). *Clin Pharmacol*. 2013;5:53-8.
77. Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85:1735-50.
78. Brandelli A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess Technol*. 2008;1:105-16.
79. Vignardet C, Guillaume YC, Michel L, Friedrich J, Millet J. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *Int J Pharm*. 2001;224:115-22.
80. Bersanetti PA, Park HY, Bae KS, Son KH, Shim DH, Hirata IY, Juliano MA, Carmona AK, Juliano L. Characterisation of Arazyme, an exocellular metalloprotease isolated from *Serratia proteamaculans* culture medium. *Enzyme Microb Technol*. 2005;37:574-81.
81. Burge S. Cohesion in the epidermis. *Br J Dermatol*. 1994;131:153-9.
82. Chapman SJ, Walsh S. Desmosomes, corneodesmosomes, and desquamation – an ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch Dermatol Res*. 1990;282:304-10.
83. Suzuki Y, Nomura J, Koyama J, Horii I. The role of proteases in stratum corneum: involvement in stratum corneum desquamation. *Arch Dermatol Res*. 1994;286:249-53.
84. Rawlings AV, Watkinson A, Rogers J, Mayo A, Scott IR. Abnormalities in stratum corneum structure, lipid composition and desmosome degradation in soap-induced winter xerosis. *J Soc Cosmet Chem*. 1994;45:203-20.
85. El-Kadi KN, Rawlings AV, Feinberg C, Watkinson A, Nunn CC, Battaglia A, Chandar P, Richardson N, Pocalyko DJ. Broad specificity alkaline proteases efficiently reduce the visual scaling associated with soap-induced xerosis. *Arch Dermatol Res*. 2001;293:500-7.
86. Dessinioti C, Katsambas A. Seborrheic dermatitis: etiology, risk factors, and treatments: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013;31:343-51.

87. Longshaw CM, Wright JD, Farrell AM, Holland KT. *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. J Appl Microbiol. 2002;93:810-6.
88. Riffel A, Ortolan S, Brandelli A. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. J Chem Technol Biotechnol. 2003;78:855-9.
89. Mohorcic M, Torkar A, Friedrich J, Kristl J, Murdan S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. Int J Pharmac. 2007;332:196-201.
90. Langeveld JPM, Wang JJ, van de Wiel DFM, Shih GC, Garssen GJ, Bossers A. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. J Infect Dis. 2003;188:1782-9.
91. Yoshioka M, Miwa T, Horii H, Takata M, Yokoyama T, Nishizawa K. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. J Appl Microbiol. 2007;102:509-15.
92. Ravanti L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in wound repair. Int J Mol Med. 2000;6:391-407.
93. Davidenko TI, Chuenko AV, Zakharova IY, Bondarchuk AA, Kondratyuk VI, Kovalenko VN. Immobilized Elastoterase. Pharm Chem J. 1997;31:396-400.
94. Shi L, Carson D. Collagenase santyl ointment: a selective agent for wound debridement. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2009;36:S12-16.
95. Khare SD, Krco CJ, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. Oral administration of an immunodominant human collagen peptide modulates collagen-induced arthritis. J Immunol. 1995;155:3653-9.
96. Gilpin D, Coleman S, Hall S, Houston A, Karrasch J, Jones N. Injectable collagenase *Clostridium histolyticum*: a new nonsurgical treatment for Dupuytren's disease. J Hand Surg Am. 2010;35:2027-38.
97. Gelbard M, Goldstein I, Hellstrom WJ, McMahon CG, Smith T, Tursi J, Jones N, Kaufman GJ, Carson CC. Clinical efficacy, safety and tolerability of collagenase *Clostridium histolyticum* for the treatment of peyronie disease in 2 large double-blind, randomized, placebo controlled phase 3 studies. J Urol. 2013;190:199-207.
98. Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. Biochem J. 2004;383:311-8.
99. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Science. 2002;297:2275-9.
100. Gracies JM, Simpson DM. Botulinum toxin therapy. Neurologist. 2000;6:98-115.
101. Bachur TPR, Veríssimo DM, Souza MMC, Vasconcelos MM, Sousa FCF. Toxina botulínica: de veneno a tratamento. Rev Eletrônica Pesq Med. 2009;3:9-19.
102. Blau L, Menegon RF, Chung MC. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. Química Nova. 2006;29:1307-17.

103. Kasana RC, Salwan R, Yadav SK. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37:262-76.
104. Kuddus M, Ramteke PW. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. *Crit Rev Microbiol*. 2012;38:330-8.
105. Araújo R, Casal M, Cavaco-Paulo A. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatal Biotransform*. 2008;26:332-49.
106. Hassan MA, Haroun BM, Amara AA, Serour EA. Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from egyptian ecosystem. *BioMed Res Int*. 2013;2013:175012.
107. Infante I, Morel MA, Ubalde MC, Martínez-Rosales C, Belvisi S, Castro-Sowinski S. Wool-degrading *Bacillus* isolates: extracellular protease production for microbial processing of fabrics. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26:1047-52
108. Sumana D, Sudarshan M, Thakur AR, Ray Chaudhuri S. Degumming of raw silk fabric with help of marine extracellular protease. *Am J Biochem Biotechnol*. 2013;9:12-8.
109. Karapinar E, Sariisik MO. Scouring of cotton with cellulases, pectinases and proteases. *Fibres Textiles Eastern Europe*. 2004;12:79-82.
110. Gashti MP, Assefipour R, Kiumarsi A, Gashti MP. Enzymatic surface hydrolysis of polyamide 6,6 with mixtures of proteolytic and lipolytic enzymes. *Preparative Biochem Biotechnol*. 2013;43:798-814.
111. Silva C, Cavaco-Paulo A. Monitoring biotransformations in polyamide fibres. *Biocatal Biotransform*. 2004;22:357-60.
112. Thanikaivelan P, Rao JR, Nair BU, Ramasami T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends Biotechnol*. 2004;22:181-8.
113. Dalev PG. Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour Technol*. 1994;48:265-7.
114. Jacobson JW, Glick JL, Madello KL, inventors. Composition for cleaning drains clogged with deposits containing hairs. United States patent. US4540506A; 1985 Sep 10.
115. Fujiwara N, Tsumiya T, Katada T, Hosobuchi T, Yamamoto K. Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. *Process Biochem*. 1989;24:155-6.

RMN NO DOMÍNIO DO TEMPO: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES OFFLINE E INLINE

Luiz Alberto Colnago
Fabiana Diuk de Andrade

12.1 INTRODUÇÃO

A descrição do fenômeno de ressonância magnética nuclear (RMN) foi publicada em 1946 por dois grupos independentes: o dos físicos Purcell, Torrey e Pound, da Universidade de Harvard, e o de Bloch, Hansen e Packard, da Universidade de Stanford. Logo no início da década de 1950 a RMN já era usada para a solução de problemas químicos. Em menos de dez anos após a sua descoberta, o primeiro espectrômetro de RMN de alta resolução para ^1H em onda contínua já estava no mercado¹⁻⁴.

A RMN foi um grande salto para a determinação estrutural de moléculas orgânicas, reduzindo o tempo de elucidação da estrutura de moléculas orgânicas em várias ordens de grandeza⁵. No final dos anos 1960, um novo patamar da RMN foi obtido com a introdução dos espectrômetros pulsados, com a transformada de Fourier (do inglês *Fourier transform-nuclear magnetic resonance* – FT-NMR) e dos ímãs supercondutores¹⁻³. No início da década de 1970, duas novas técnicas foram introduzidas: a RMN multidimensional e a

tomografia por ressonância magnética nuclear, conhecida atualmente como ressonância magnética.

A RMN multidimensional proporcionou não só um novo salto para a determinação da estrutura de moléculas orgânicas de baixa massa molecular, mas também revolucionou a bioquímica como uma ferramenta de determinação da estrutura tridimensional de proteínas em solução.

A tomografia por ressonância magnética teve seu avanço inicial mais lento que a RMN multidimensional, pois foi necessário o desenvolvimento de toda uma nova tecnologia para a construção dos equipamentos. Diferentemente dos espectrômetros de RMN, os tomógrafos necessitam de ímãs de grande massa e volume, o que consequentemente eleva seus custos. No entanto, no final da década de 1980, experimentos com seres humanos começaram a ser realizados em alguns laboratórios universitários e nas indústrias de equipamentos médicos. Apesar dos altos custos, os tomógrafos de ressonância magnética logo passaram a ser uma das mais importantes ferramentas da medicina, substituindo o tomógrafo de raios X na maioria dos diagnósticos por imagens.

Devido ao grande impacto que as técnicas de RMN tiveram tanto nas ciências básicas quanto nas aplicadas, vários cientistas foram premiados pela Fundação Nobel por suas descobertas. Em 1952, Felix Bloch e Edward Mills Purcell foram reconhecidos com o prêmio Nobel de Física pela descoberta do fenômeno de RMN; em 1991, Richard Ernst recebeu o prêmio Nobel de Química pelo desenvolvimento da RMN pulsada com transformada de Fourier e RMN multidimensional; em 2002, Kurt Wüthrich recebeu o prêmio Nobel de Química pelo uso da RMN multidimensional para determinar a estrutura tridimensional de proteínas; e, em 2003, Paul Lauterbur e Peter Mansfield receberam o prêmio Nobel de Medicina pela introdução da ressonância magnética por imagem.

Além da química orgânica, bioquímica e medicina, a RMN em alta resolução também é empregada em muitas outras aplicações, em áreas como materiais, química inorgânica, alimentos, análises químicas *in vivo*, metabólica, petróleo, entre outras. Uma nova área na qual a RMN começa a se tornar importante é o controle e certificação da qualidade (CCQ) de produtos e processos industriais. Nessa aplicação utilizam-se espectrômetros de RMN de baixo custo, massa e volume, quando comparados com os de RMN em alta resolução em alto campo.

Esses aparelhos são conhecidos como RMN no domínio do tempo (RMN-DT); RMN em baixo campo (RMN-BC) e RMN em baixa resolução (RMN-BR). Essas denominações vêm do fato de os sinais de RMN nesses

espectrômetros serem analisados no domínio do tempo (DT), ou seja, sem a necessidade da transformada de Fourier. Esses espectrômetros normalmente utilizam ímãs de baixo campo (BC) de até 0,5 T (20 MHz para o ^1H), e usam ímãs de baixa homogeneidade, que leva a espectros em baixa resolução (BR), com largura de linhas de até centenas de kHz. Assim, nesses espectrômetros não se observa o efeito do deslocamento químico ou de qualquer outra interação que resolva o espectro em mais de uma linha. Ou seja, independentemente da amostra, só se observa uma linha nesses espectrômetros. Por isso, na RMN-DT se analisa a amplitude do(s) sinal(is) do decaimento livre da indução (do inglês *free induction decay* – FID) ou a recuperação do seu sinal na forma de eco(s) em função do tempo. Assim, neste capítulo serão descritos os fundamentos e aplicações da RMN-DT desde o modo *offline* até o *inline*.

12.2 FUNDAMENTOS DA RMN

A RMN é observada quando certos núcleos atômicos, como, por exemplo, ^1H , ^{13}C , ^{19}F , que possuem momento angular ou *spin* (L) e momento magnético μ , são submetidos a um campo magnético estático, denominado B_0 , e a um campo magnético oscilante, denominado B_1 .

O campo magnético B_0 faz com que μ precessione* com uma frequência angular denominada frequência de Larmor, ω_0 . A frequência de precessão é proporcional ao campo magnético, B_0 , e à razão magnetogírica, γ , tal que:

$$\text{(Equação 12.1)} \quad \omega_0 = \gamma B_0 \quad \text{ou} \quad \nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

em que γ é uma constante intrínseca de cada núcleo.

O efeito de B_0 sobre μ também dá origem a uma magnetização resultante, M_0 , que correspondente ao somatório dos momentos magnéticos no eixo z (Equação 12.2, Figura 12.1).

$$\text{(Equação 12.2)} \quad M_0 = \sum \mu$$

Para a obtenção do sinal de RMN, o campo magnético oscilante, B_1 , com frequência ω_0 é aplicado perpendicularmente a B_0 (Figura 12.1) e na forma de um pulso (espectrômetro pulsado).

* A precessão é um fenômeno físico que consiste na mudança de orientação do eixo de rotação de um objeto.

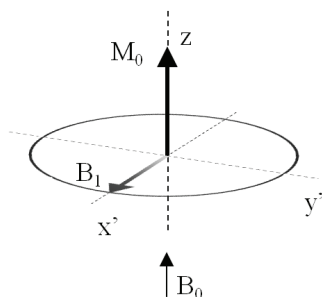


Figura 12.1 Representação do fenômeno de RMN no sistema de coordenadas girantes, no qual o plano xy gira com uma frequência angular próxima a ω_0 . Neste sistema, os eixos x e y são denominados x' e y' para diferenciá-los do sistema de coordenada de laboratório⁴. Na presença de um campo magnético externo (B_0), amostras com núcleos com L e μ originam uma magnetização resultante, M_0 . O campo magnético oscilante, B_1 , aplicado perpendicularmente a B_0 , é usado para excitar a amostra.

O pulso faz com que a magnetização M_0 , que estava originalmente na direção do campo B_0 (eixo z), gire um ângulo θ , proporcional à duração do pulso (t_p), à intensidade do campo B_1 e a γ (Equação 12.3). O pulso leva a uma magnetização no plano $x'y'$, originando as componentes M_x e M_y .

$$\text{(Equação 12.3)} \quad \theta = \gamma B_1 t_p$$

Após o pulso, a magnetização no plano $x'y'$ volta a precessionar em torno de B_0 e induz o sinal de RMN na bobina da sonda, denominado de decaimento livre da indução (FID). Após o pulso, o FID passa por dois processos de relaxação distintos: a relaxação longitudinal (T_1), que está envolvida no retorno da magnetização ao equilíbrio térmico; e a relaxação transversal (T_2), que está relacionada ao desaparecimento do sinal no plano $x'y'$. Esses tempos de relaxação interferem diretamente na quantificação da técnica, largura da linha, decaimento do FID, entre outras variáveis.

12.2.1 FID

Como $T_1 \geq T_2$, o decaimento do FID em um ímã perfeitamente homogêneo decai com T_2 . Entretanto, em um aparelho de RMN-DT, o FID de uma amostra líquida ou em solução decai muito mais rapidamente do que o determinado por T_2 . Nesses aparelhos, o decaimento do FID é governado pelo

tempo de relaxação efetivo, T_2^* (Equação 12.4), que normalmente possui maior contribuição da não homogeneidade do campo magnético (ΔB_0) do que do T_2 natural da amostra.

$$\text{(Equação 12.4)} \quad \frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B_0$$

A Figura 12.2 apresenta um FID (^1H) de uma amostra heterogênea, contendo componentes no estado sólido (estrutura rígida) e no estado líquido (alta mobilidade). Essas amostras podem ser, por exemplo, sementes oleaginosas, polímeros com monômeros, alimentos, tecidos biológicos, entre outros materiais heterogêneos.

Considerando que a amostra é uma semente oleaginosa, logo após o pulso, o FID correspondente a todos os componentes da semente que contêm hidrogênio, tais como óleo, carboidratos, proteínas e água⁷. Na expansão de parte da Figura 12.2 é possível observar que a parte inicial do FID (A) decai durante o tempo morto do espectrômetro. O tempo morto é definido pelo período no qual as interferências ocasionadas pelas imperfeições

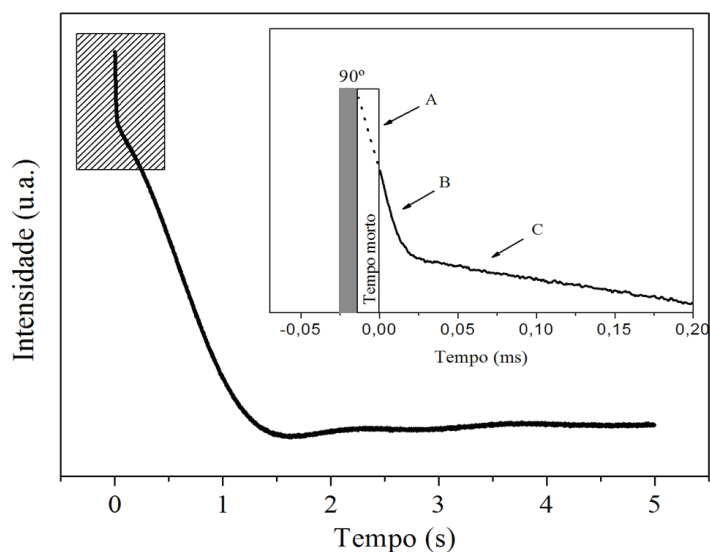


Figura 12.2 FID de uma semente de amendoim após um pulso de 90° em um espectrômetro de RMN-DT. A expansão do sinal mostra o pulso, o tempo morto do espectrômetro e o início do sinal FID. A linha tracejada (A) mostra o sinal FID durante o tempo morto contendo todos os componentes da semente. O FID em (B) mostra parte do sinal dos componentes sólidos sobreposta ao dos componentes líquidos. O FID em (C) contém somente o sinal dos componentes móveis da semente.

instrumentais são maiores do que o sinal do FID. Durante o tempo morto de 11 ms, nesse espectrômetro, a maioria do sinal FID dos componentes rígidos da semente, como proteínas, carboidratos e água ligada, decaem a uma fração da intensidade inicial, por apresentarem T_2 muito curto, da ordem de décimos de microssegundos^{7,8}. Consequentemente, apenas uma pequena parte do FID desses componentes (B) pode ser medida. No componente (C) do FID estão apenas os sinais dos componentes no estado líquido, o óleo e água livre. Como eles têm um T_2 de dezenas a centenas de milissegundos, o decaimento do FID (C) é governado, principalmente pela não homogeneidade do campo magnético (ΔB_0) (Equação 12.4)^{7,8}. A intensidade do FID a algumas dezenas de microssegundos após o pulso tem sido usada para a análise quantitativa de componentes líquidos em amostras homogêneas e heterogêneas. A intensidade do FID (RMN de ^1H) é usada para medir o teor de hidrogênio em combustíveis, teor de óleo, umidade em alimentos, produtos agrícolas, produtos químicos, materiais poliméricos, cimentos, entre outras medidas. O FID do ^{19}F é usado para determinar o teor de fluoreto em dentifrícios.

12.2.2 Relaxação longitudinal

O mecanismo de relaxação longitudinal, *spin-rede* ou T_1 , está relacionado ao retorno da magnetização ao estado de equilíbrio térmico, M_0 . Essa relaxação é resultante da existência de momentos magnéticos transitórios produzidos pelos movimentos rotacionais e translacionais de moléculas da vizinhança, oscilando com frequências apropriadas em torno da frequência de Larmor. A taxa de relaxação $1/T_1$ é máxima quando a frequência do campo magnético flutuante, provocado pela rotação da molécula (τ_c), equivale à frequência de Larmor ($\tau_c \approx 1/\omega_0$). Fora dessa condição, a relaxação longitudinal tende a ser menos eficiente.

O T_1 é responsável pela recuperação exponencial do módulo da magnetização, ao longo do eixo z (M_z) dado pela Equação 12.5:

$$\text{(Equação 12.5)} \quad M_z(t) = M_0[1 - \exp(-t/T_1)]$$

Assim, para análises quantitativas, o T_1 deve ser conhecido ou estimado para evitar a saturação de um ou mais sinais da amostra. Normalmente, é necessário um tempo de espera, T_r , de pelo menos $5T_1$ entre cada varredura

do espectro de RMN para que a magnetização M_z retorne aproximadamente 99% de M_0 .

A Figura 12.3A mostra a sequência de pulsos mais usada para medir T_1 , a sequência de inversão-recuperação (IR). Essa sequência consiste em um pulso de 180° , para inverter a magnetização, seguido por um tempo τ (variável) e um pulso de 90° para medir a intensidade do FID. Essa sequência também é representada esquematicamente por $(180^\circ - \tau - 90^\circ)_n$. A Figura 12.3B apresenta um gráfico da variação da intensidade do FID em função de τ .

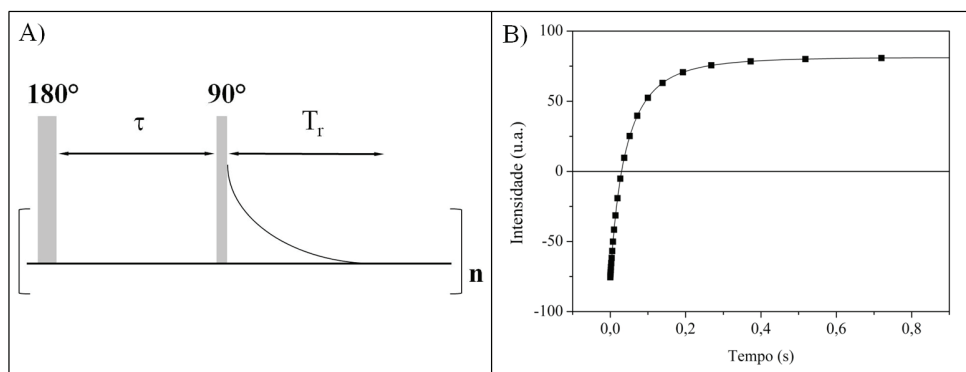


Figura 12.3 (A) Sequência de pulsos inversão-recuperação. (B) Variação da amplitude do sinal em função de τ .

A Figura 12.4 apresenta uma descrição vetorial do comportamento dos *spins* durante a sequência IR. A Figura 12.4A exibe a magnetização no equilíbrio térmico. O pulso de 180° inverte a magnetização da direção z (M_z) para $-z$ (Figura 12.4B). Durante o tempo τ , entre B e C, ocorre a relaxação. Dependendo do tempo τ e do T_1 , há uma distribuição da magnetização entre z e $-z$, conforme vetores cinza e preto da Figura 12.4C. Para valores de $\tau \ll T_1$, a componente $-z$ (preta) é bem maior do que a componente z (cinza). Para valores de $\tau \gg T_1$, a componente em z é maior do que a $-z$. Se $\tau \sim 5T_1$, a componente z atinge aproximadamente 99% do valor de M_0 . Para detectar as componentes no eixo z , que são dependentes de τ e de T_1 , aplica-se um pulso de 90° para rotacionar a magnetização para o plano $x'y'$ (Figura 12.4D), onde se faz a medida da intensidade do sinal de RMN. A componente que estava no eixo z (Figura 12.4C), vai para a direção y (cinza), e a componente que estava na direção $-z$ vai para a direção $-y$ (preta). Como o sinal de RMN é a resultante da magnetização no plano $x'y'$, o sinal de RMN

na sequência IR varia de negativo a positivo (Figura 12.3B) dependendo do valor de τ e T_1 . Pode-se calcular o valor de T_1 com a Equação 12.6.

$$\text{(Equação 12.6)} \quad I(\tau) = I_0[1 - 2\exp(-\tau/T_1)]$$

em que I_0 = intensidade do sinal para $T_r > 5T_1$.

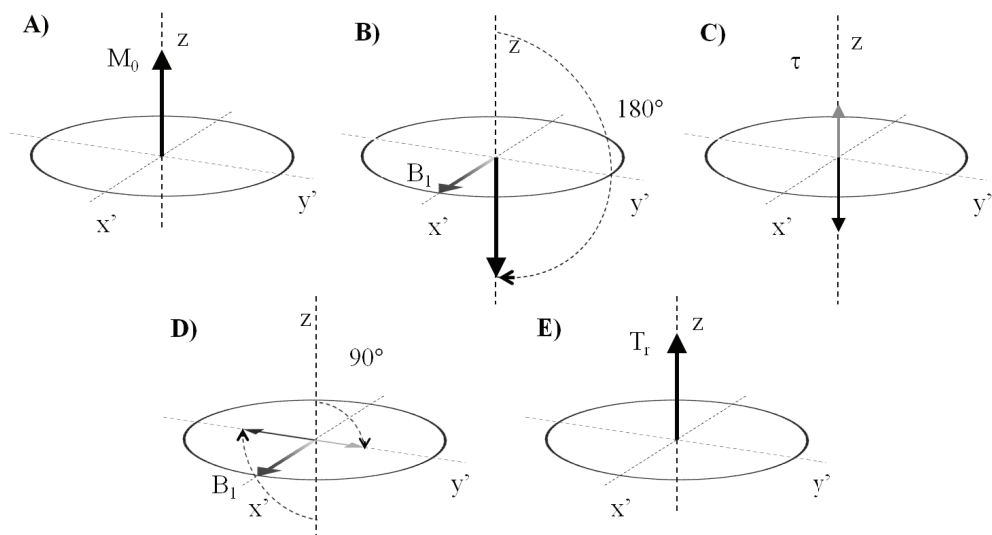


Figura 12.4 Representação vetorial da evolução da magnetização durante os eventos da sequência de pulsos inversão-recuperação.

Medidas de T_1 por IR são raramente usadas em análises qualitativa ou quantitativa devido à demora do experimento. No entanto, a sequência IR tem sido usada para suprimir sinais com diferentes valores de T_1 , ou seja, como um filtro de T_1 .

12.2.3 Relaxação transversal

O tempo de relaxação transversal, *spin-spin* ou T_2 , está relacionado à perda de coerência da magnetização no plano $x'y'$. Essa perda de coerência é atribuída às interações diretas entre os momentos magnéticos individuais dos *spins* em uma amostra. A relaxação transversal provoca um decaimento exponencial da magnetização transversal, dado pela Equação 12.7:

(Equação 12.7) $M_y(t) = M_{xy} \cos \omega_0 t \exp(-t/T_2)$

A relaxação transversal, ao contrário da longitudinal, não apresenta um valor máximo de relaxação quando $\tau_c \approx 1/\omega_0$. Ela é maior em moléculas com alta mobilidade e decresce com a redução da mobilidade molecular. Isso justifica porque, na maioria das amostras líquidas ou em solução, $T_1 \gg T_2$, enquanto nos sólidos $T_1 > T_2$.

Os métodos de medida de T_2 são baseados em sequências de eco de *spin* e serão discutidas em detalhes a seguir.

12.2.3.1 Técnicas de eco de *spin*

Como demonstrado pela Equação 12.4, a não homogeneidade do campo magnético (ΔB_0) de um aparelho de RMN-DT faz com que o FID decaia muito mais rapidamente do que pela dependência de T_2 . Para eliminar a interferência da não homogeneidade na medida do T_2 , Hahn propôs em 1950 uma sequência de dois pulsos de 90° separados por um tempo (τ). Essa sequência leva à formação de um sinal de RMN a um tempo τ do segundo pulso, ou 2τ do primeiro pulso. Ele denominou esse sinal como eco devido à sua semelhança com o eco acústico. Demonstrou que a amplitude do eco, para vários valores de τ , era independente da não homogeneidade do campo magnético. Desse modo, foi possível determinar o valor de T_2 em espectrômetro pulsado, mesmo usando ímãs heterogêneos. Hahn também observou que a intensidade do eco era atenuada quando se usava materiais poucos viscosos, com alto coeficiente de difusão molecular. Isso ocorria em ímãs muito heterogêneos, ou seja, com gradiente de campo magnético muito intenso, ou quando o tempo τ era longo. A técnica original de Hahn encontrou poucas aplicações, pois logo em 1954 Carr e Purcell substituíram o segundo pulso de 90° por um pulso de 180° (Figura 12.5A).

A sequência de pulso de Carr-Purcell, $90^\circ - \tau - 180^\circ$ (Figura 12.5A), denominada método A ou eco de *spin*, produz um FID após o primeiro pulso, cujo decaimento é governado por T_2^* . O pulso de 180° , após o tempo τ , refocaliza a magnetização perdida pela não homogeneidade de campo e gera um sinal (eco) a um tempo τ do segundo pulso. O eco nessa sequência está defasado de 180° do FID. Normalmente se usa o sinal no modo magnitude, e o decaimento do eco em função de T_2 é representado pela linha pontilhada da Figura 12.5A.

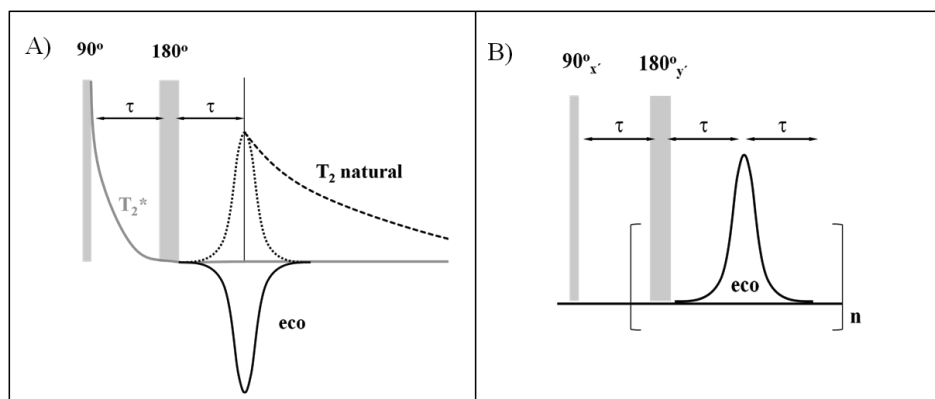


Figura 12.5 (A) Sequência de eco de *spin* 90° – τ – 180° . O eco com linhas contínuas está no modo fase, com deslocamento de 180° em relação ao FID, e o eco com linha pontilhada está no modo magnitude. (B) Sequência de pulsos da técnica de CPMG, em que o pulso de 180° está defasado de 90° em relação ao primeiro pulso⁹.

Para a medida de T_2 , tanto no método de Hahn quanto no método A de Carr-Purcell, é necessário fazer a aquisição da intensidade do sinal para vários valores de τ . Porém, entre cada aquisição é necessário esperar um tempo (T_r) de pelo menos cinco vezes T_1 ($T_r \geq 5T_1$) para o retorno do sistema ao equilíbrio térmico. Isso torna o tempo total de medida de T_2 muito longo. Assim como na sequência de Hahn, a intensidade dos sinais de eco na sequência 90° – τ – 180° tem dependência da difusão molecular quando são usadas amostras líquidas com baixa viscosidade, longo tempo τ e campos magnéticos não homogêneos¹⁰. Por isso, essa sequência não é indicada para a medida de T_2 de componentes em fase líquida em aparelhos de RMN-DT.

No entanto, as técnicas de eco de *spin* têm sido usadas para análise qualitativa ou quantitativa quando se deseja separar dois componentes baseados na diferença de T_2 . Esses métodos normalmente medem a amplitude do FID logo após o tempo morto do espectrômetro e a amplitude do eco no tempo 2τ . Esse procedimento é usado para medir a fração sólido-líquido em margarinas e manteigas, umidade e teor de óleo em sementes, entre outras aplicações.

Carr e Purcell também propuseram uma sequência de pulsos denominada Método B ou CP para minimizar ou eliminar o problema de difusão e acelerar a medida de T_2 ¹⁰. Nessa sequência, eles não aplicaram apenas um pulso de 180° após o primeiro pulso de 90° , mas um trem de pulsos de 180° .

Esse trem de pulsos de 180° , separados por 2τ , gera um eco entre os pulsos de 180° , até o completo desaparecimento do sinal, devido ao T_2 natural da amostra. Essa nova sequência permitiu que todo o decaimento do sinal de RMN (ecos) fosse adquirido em uma única sequência de pulsos. Assim, o método CP economiza tempo, pois permite obter os ecos necessários para a medida de T_2 em uma única medida, e não é necessário esperar o sistema se relaxar completamente ($5T_1$) entre cada eco. Além disso, com esse método é possível usar valores de τ muito pequenos, eliminando consideravelmente o efeito de difusão da amostra na intensidade do eco.

Apesar de toda a vantagem da técnica CP sobre as sequências de eco de *spin* e eco de Hahn, ela necessita que os pulsos de 180° sejam muito bem calibrados, para não levar a erros na medida de T_2 . Para eliminar essa deficiência, Meiboom e Gill (1958) modificaram a sequência CP aplicando os pulsos de 180° no eixo y' , isto é, com uma diferença de fase de 90° em relação ao pulso de 90° inicial⁹. Essa nova sequência (Figura 12.5B) aperfeiçoou o método de Carr-Purcell, originando o método chamado CPMG⁹.

A Figura 12.6 descreve a evolução da magnetização na sequência CPMG. O pulso de 90° , aplicado em eixo x' , faz com que a magnetização

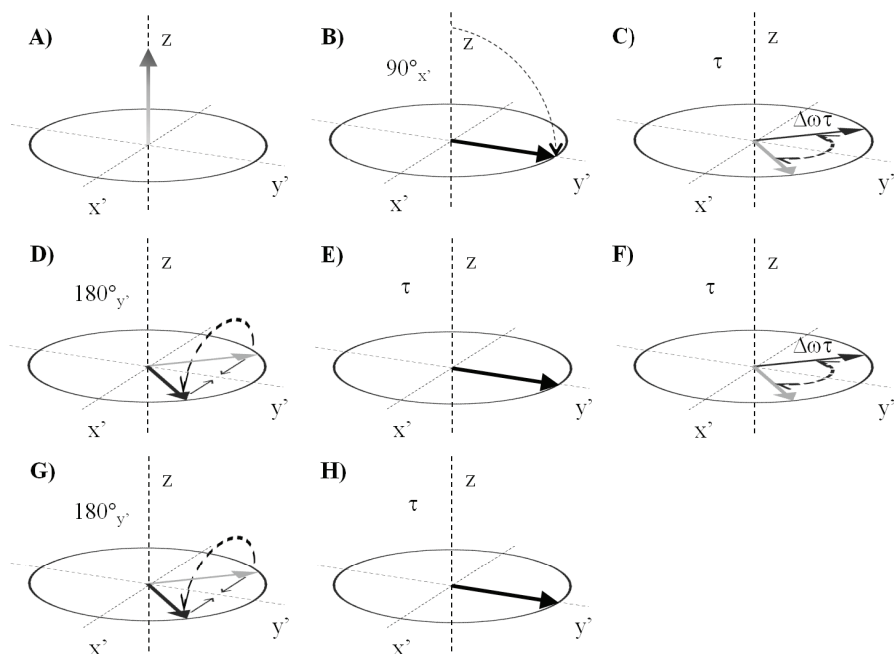


Figura 12.6 Representação vetorial da evolução temporal da magnetização na sequência de pulsos CPMG.

no equilíbrio térmico (A) gire por esse ângulo, ou seja, até o plano $x'y'$ (B). Durante o tempo τ , as isocromatas de *spins* (cinza e preta) se defasam devido à não homogeneidade de campo (C). Um pulso de 180° aplicado em $-y'$ (D) gira as componentes no plano $x'y'$, invertendo a direção dos dois vetores. Como eles mantêm o mesmo sentido de rotação, eles se reencontram (são refocalizados) no eixo $-y'$, no tempo 2τ (E), a partir do primeiro pulso. Após isso, ocorre outra defasagem em outro tempo τ (F). Um segundo pulso de 180° , em $-y'$, gira novamente a magnetização (G) e o sinal de eco em 4τ (H)⁹. Esse procedimento de defasagem e refocalização com pulsos de 180° ocorre até o desaparecimento completo do sinal em função de T_2 . A mudança de fase proposta por Meiboom e Gill, além de eliminar o problema de calibração dos pulsos de 180° , também fez com que todos os ecos tivessem uma mesma fase, o que não ocorre com o método CP.

O método CPMG é hoje o método padrão para a medida de T_2 dos componentes com alta mobilidade e é largamente usado para análises qualitativas e quantitativas na RMN-DT. É usado na avaliação da qualidade de alimentos, petróleo, produtos agrícolas etc. Essas análises são baseadas, principalmente, nas diferenças entre os tempos de relaxação transversal, T_2 , dos vários componentes da amostra. Os sinais CPMG vêm sendo analisados através de ajustes mono e multiexponencial, pela transformada inversa de Laplace (ILT) e também por métodos quimiométricos^{7,8}.

12.2.4 Medidas rápidas e simultâneas de T_1 e T_2

Como descrito anteriormente, a medida de T_1 em aparelhos de RMN-DT é muito pouco usada devido ao longo tempo necessário para se fazer as medidas. Assim, vários métodos têm sido propostos para reduzir o tempo de medidas, entre os quais estão alguns métodos de precessão livre no estado estacionário (do inglês, *steady state free precession* – SSFP), que permitem medir tanto T_1 quanto T_2 em um único experimento. Entre esses métodos, destacamos aqueles denominados CWFP e CP-CWFP.

A sequência *continuous wave free precession* (CWFP) é composta por um trem de pulsos 90° , separados por um tempo τ , da ordem de $T_2^* \ll T_1$ e T_2 . O sinal gerado pela sequência CWFP, a partir do equilíbrio térmico, passa por dois estados transientes antes de atingir o estado estacionário¹¹. O primeiro estado transiente é caracterizado por uma alternância de amplitude do sinal entre valores máximos e mínimos e pela constante de tempo denominada T_2^* . Esse estado é seguido por um estado *quasi*-estacionário, em que essas

alternâncias de amplitude desaparecem e o sinal decai exponencialmente até o estado estacionário (EE). A passagem do estado *quasi*-estacionário para o estacionário CWFP, usando pulsos de 90°, ocorre com uma constante de tempo dada pela Equação 12.8, dependente tanto de T_1 quanto de T_2 ¹¹.

$$(Equação 12.8) \quad T^* = \frac{2T_1T_2}{(T_1+T_2)}$$

A amplitude do sinal no estado estacionário (EE) é constante e não depende de T_1 , mas sim da razão T_1/T_2 de acordo com a Equação 12.9^{12,13}:

$$(Equação 12.9) \quad M_{EE} = \frac{M_0T_2}{(T_1+T_2)}$$

onde M_{EE} é a intensidade do sinal no estado estacionário e M_0 é a intensidade do sinal no equilíbrio térmico.

Combinando as equações 12.8 e 12.9, é possível determinar os valores de T_1 e T_2 em um único experimento¹¹, por meio das equações 12.10 e 12.11, e as amplitudes do sinal após o primeiro pulso (proporcional a M_0) e no estado estacionário (M_{EE}) e a constante de tempo T^* .

$$(Equação 12.10) \quad T_1 = \frac{\frac{T^*(\alpha=\pi/2)}{2}}{\frac{M_{EE}}{M_0}}$$

e

$$(Equação 12.11) \quad T_2 = \frac{\frac{T^*(\alpha=\pi/2)}{2}}{1 - \frac{M_{EE}}{M_0}}$$

Além do CWFP, Andrade et al. desenvolveram, em 2012¹⁴, um novo método para medir T_1 e T_2 de maneira rápida e simultânea. Esse método é baseado na sequência Carr-Purcell (CP) com ângulos de refocalização de 90°. Ele foi denominado CP-CWFP devido à sua semelhança com a sequência CWFP, principalmente em relação à sua dependência de T_1 e T_2 (14). CP-CWFP é mais eficiente que CWFP para medidas dos tempos de relaxação quanto $T_1 \sim T_2$, situação normalmente observada em medidas por RMN em baixo campo.

As sequências CWFP e CP-CWFP têm sido utilizadas para análises quantitativas e qualitativas nas áreas de produtos agropecuários, alimentos *in natura* e industrializados^{11,14}.

12.2.5 Análise dos componentes sólidos por RMN-DT

Até agora, a maioria das análises foram realizadas em amostras líquidas, soluções ou do componente líquido em amostras heterogêneas. A análise de materiais sólidos ou do componente sólido em amostras heterogêneas é bem mais complexa, uma vez que o sinal de RMN decai muito rapidamente.

Como visto anteriormente, a obtenção do FID de componentes sólidos é limitada pelo tempo morto do espectrômetro. Assim, tem se desenvolvido espectrômetros com tempo morto cada vez menores (atualmente, em alguns ms) e de métodos de eco que refocalizam o sinal dos componentes sólidos¹⁵. Os espectrômetros com tempo morto muito curto ainda não são de uso geral, e, por isso, os métodos de refocalizar o sinal dos componentes rígidos têm sido mais usados¹⁵.

O primeiro método ou sequência de pulso usada para minimizar o efeito do tempo morto no sinal do componentes sólido foi o eco de sólidos. Essa sequência consiste em um pulso de 90° no eixo x' ($90^\circ_{x'}$), um tempo τ e um pulso de 90° no eixo y' ($90^\circ_{y'}$). Essa sequência de pulsos refocaliza um sinal de RMN, na forma de um eco, cuja intensidade no tempo τ , após o segundo pulso, contém o sinal dos componentes sólidos. Mais recentemente, Maus e colaboradores propuseram a sequência chamada *magic-sandwich echo* com o decaimento do FID (MSE-FID) (Figura 12.7A). Essa sequência, apesar de sua complexidade, com vários tempos de espera e pulsos com diferentes fases, pode ser implementada na maioria dos espectrômetros de RMN-DT comerciais. Sua principal vantagem é recuperar uma maior parte do sinal dos componentes sólidos, em comparação com a sequência eco de sólidos. Com isso, a sequência MSE-FID é, atualmente, a melhor maneira de se obter o sinal tanto dos componentes sólidos quanto dos líquidos de uma amostra heterogênea¹⁵.

Apesar da simplicidade e popularidade dos experimentos de eco de *spin* e CPMG para líquidos, existem sérias críticas sobre a análise quantitativa de sólidos no que diz respeito à interpretação das curvas de relaxação em termos de acoplamentos residuais e tempos de correlação dos processos dinâmicos envolvidos¹⁰⁻¹². Os problemas mais comuns se referem à validade dos modelos usados para ajustar as curvas de relaxação, interdependência dos parâmetros de ajuste e sensibilidade a fatores que influenciam a relaxação, mas não são cobertos pelos modelos. Particularmente, a presença de regiões dinamicamente restritas faz com que a interação dipolar residual H-H se torne dominante, não sendo refocalizada nos ecos de CPMG.

Para minimizar esses problemas, têm sido desenvolvidas sequências de pulsos que fazem uma melhor quantificação dos acoplamentos dipolares residuais. Essas sequências são combinações de ecos de Hahn e ecos sólidos¹⁶, RMN de difusão de *spins* bidimensional¹⁷ e, mais recentemente, técnicas de ^1H de duplo quantum (HDQ) e múltiplo quantum (HMQ)¹⁸⁻²⁰.

12.2.5.1 RMN de difusão de *spins*

Os experimentos de difusão de *spins* são baseados na transferência de magnetização via interação dipolar homonuclear, que ocorre através de processos de troca dos estados $\alpha\beta$ por $\beta\alpha$ e vice-versa (*flip-flop*). Os estados α e β são os estados de menor e maior energia, respectivamente. O experimento de difusão de *spins* proposto inicialmente por Goldman e Shen consiste na seleção prévia da magnetização de ^1H móvel do material (por exemplo, fase com cadeias de alta mobilidade molecular), seguido do monitoramento da difusão dessa magnetização para os núcleos de ^1H . A taxa a que tal difusão ocorre está correlacionada com a constante de difusão entre os núcleos de ^1H da fase móvel e da fase rígida, que, por sua vez, depende da intensidade do acoplamento dipolar correspondente, do tamanho dos domínios formados por cada fase e da presença de gradiente de mobilidade da fase móvel.

Uma forma mais eficiente de se realizar o experimento de Goldman-Shen é através da utilização de um filtro dipolar, que consiste de um trem de pulsos de 90° , espaçados por um tempo τ , e uma ciclagem de fases tal como mostrado na Figura 12.7B²¹. Neste caso, o filtro dipolar promove a seleção da fase móvel, já que durante esse período a magnetização da fase rígida defasa rapidamente no plano transversal. Enquanto que a da fase móvel permanece. Após a seleção pelo filtro dipolar, a magnetização da fase móvel é transferida para o eixo z durante t_m , onde a difusão de *spins* pode acontecer. Após t_m a magnetização é novamente transferida para o plano transversal onde é detectado. Monitorando o sinal da fase móvel como função de t_m é possível obter a taxa de difusão de *spins* (taxa com que a magnetização da fase móvel diminui devido à difusão para a fase rígida) e a partir daí, a dimensão do domínio formado pela fase móvel. É ainda possível fazer o experimento inverso, ou seja, seleciona-se a magnetização da fase rígida com uma sequência de pulsos adequada e monitora-se a difusão para a fase móvel.

Estudos específicos com a aplicação dessa sequência no estudo de homopolímeros demonstraram que é possível utilizá-la para descrever a dinâmica molecular de polímeros que contenham grupos químicos com significantes

diferenças de mobilidade²². Esse método é utilizado para investigar os tamanhos de domínios (tais como regiões de *crosslinks*, por exemplo) e morfologia de polímeros heterogêneos²³.

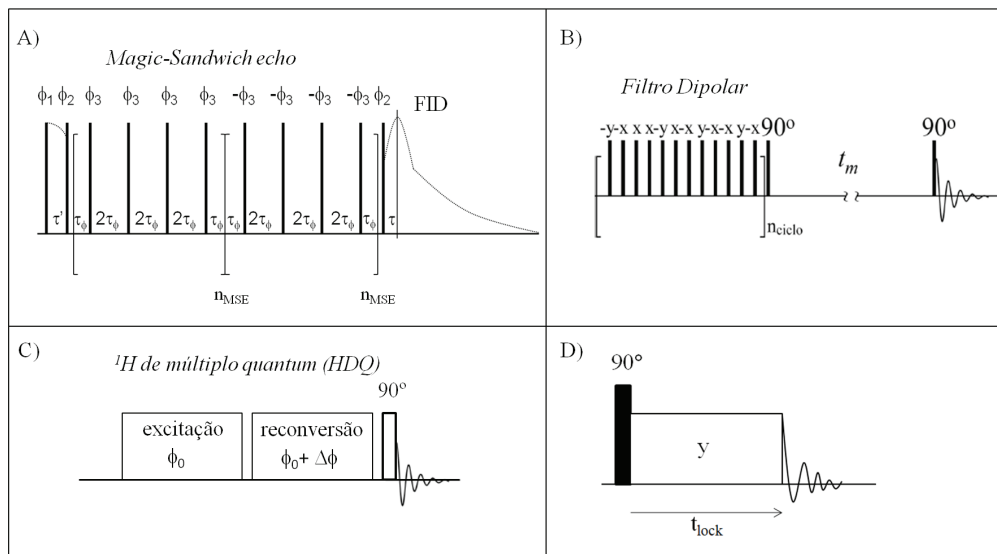


Figura 12.7 (A) Sequência *magic-sandwich echo* (MSE) combinada com FID. (B) Sequência de difusão de *spins*²¹. (C) Sequências de pulsos utilizada no experimento de HMQ. (D) Sequência de pulso *spin-lock*, t_{lock} corresponde ao tempo de aplicação de B_{1SL} .

12.2.5.2 1H de duplo quantum (HDQ) e múltiplo quantum (HMQ)

Nas técnicas de RMN de duplo quantum (HDQ) são aplicadas sequências de pulsos complexas (Figura 12.7C). O sinal resultante dessa sequência de pulsos depende da evolução temporal da magnetização, na presença de coerência de duplo quantum, que só aparecem quando existe acoplamento dipolar residual.

No período de excitação, a sequência de pulsos maximiza a geração de coerências de múltiplo quantum que evoluem durante esse período (Figura 12.7C). Em seguida, no período de reconversão, essas coerências são reconvertidas em coerências de quantum único, gerando uma magnetização que pode ser detectada e cuja amplitude é modulada por um fator que depende da evolução das coerências de múltiplo quantum. A seleção de uma coerência específica pode também ser realizada através de ciclagem de fase. Em

campo magnético baixo, a quantificação é realizada monitorando a amplitude do sinal no domínio do tempo como função do período de excitação das coerências de múltiplo quantum.

Na técnica de CPMG, a informação estrutural e dinâmica é quantificada através de um único decaimento (T_2). Na técnica de HMQ, as curvas em que todas as coerências são excitadas só dependem da dinâmica do sistema, enquanto que, nas curvas onde o sinal obtido pela excitação de, somente uma ordem específica de coerência, é normalizado pelo sinal referente à excitação de todas as coerências e só depende das características estruturais do sistema (densidade de regiões com dinâmica restrita).

Através de modelos específicos é possível obter diretamente as intensidades desses acoplamentos, o que tem correlação direta com a quantidade de hidrogênios dinamicamente restritos na amostra, com parâmetros físicos como a densidade de *crosslinks* em elastômeros. O mesmo esquema experimental também provê acesso a curvas que dependem da soma de coerências de várias ordens (coerências de múltiplo quantum).

Essa abordagem fornece informações quantitativas sobre a estrutura e heterogeneidades, por exemplo, a mobilidade das cadeias, sendo um marcador sensível do início de gelificação em géis no conteúdo de fração móvel, na estrutura da rede e da mobilidade das cadeias durante o curso e o fim da gelificação. O decaimento dessas curvas depende diretamente de propriedades dinâmicas do sistema e, portanto, elas podem ser usadas para analisar essas propriedades¹⁸.

Desse modo, utilizando tais técnicas, tanto informações sobre a distribuição de acoplamentos dipolares residuais quanto sobre dinâmica molecular podem ser obtidos com melhor precisão que a oferecida pelas técnicas convencionais. Outra vantagem dos métodos de HMQ é que podem também ser realizados de forma eficiente em campos magnéticos baixos²⁰.

12.2.5.3 *Spin-lock*

O método *spin-lock* (SL) permite o estudo da relaxação longitudinal no referencial girante ($T_{1\rho}$) em campos magnéticos muito baixos sem sacrificar a razão sinal/ruído. A técnica consiste na aplicação inicial de um pulso de 90°_x , que cria uma magnetização ao longo de y' no referencial de coordenadas girantes. Então um pulso contínuo é aplicado em y' , denominado de pulso de *spin-lock* (B_{1SL}), durante um tempo, t_{lock} , que trava os *spins* no plano $x'y'$, devido ao campo criado por esse pulso (ao longo de y') (Figura 12.7D).

B_{1SL} age na magnetização no referencial rotativo do mesmo modo que B_0 age na magnetização no equilíbrio térmico. Assim, ele mantém a magnetização ao longo do eixo y' durante o intervalo de tempo em que é aplicado^{24,25}.

Durante o pulso de *spin-lock* não há magnetização ortogonal a B_{1SL} , e a magnetização travada no eixo y' relaxa ao longo da direção de B_{1SL} , com uma constante de tempo denominada $T_{1\rho}$. Uma vez que a relaxação no referencial rotativo é semelhante à relaxação longitudinal em B_0 , $T_{1\rho}$ apresenta valores muito próximos de T_1 medido em um campo magnético muito baixo, na ordem de B_1 . Por outro lado, $T_{1\rho}$ pode apresentar valores próximos de T_2 . Foi demonstrado que para τ (tempo entre ecos) muito curtos ou iguais a zero, o trem de pulsos de refocalização de Carr-Purcell (CP) se aproxima da condição de *spin-lock*, e $T_{1\rho}$ medido em B_{1SL} muito baixo apresentou valores próximos de T_2 medido nessa condição.

A relação entre o tempo de relaxação $T_{1\rho}$ e a distribuição de frequência da mobilidade molecular é similar ao tempo de relaxação T_2 , onde ω_{eff} é a frequência do campo efetivo *spin-lock*, γB_{eff} , que para $T_{1\rho}$ em ressonância é igual a γB_{1SL} .

O termo densidade espectral de frequência zero é substituído por ω_{eff} . De acordo com a Equação 12.12, na presença de mobilidade molecular lenta, $T_{1\rho}$ é dominado por tempos de correlação τ_c igual a $1/2\omega_{eff}$ em vez de $1/\omega_0$ ou $1/2\omega_0$ como para T_1 ²⁵. Considerando as informações de mobilidade lenta e a correlação com os valores de T_1 e T_2 em B_0 muito baixos, $T_{1\rho}$ se apresenta como uma alternativa para análises de estruturas rígidas.

$$\text{(Equação 12.12)} \quad \frac{1}{T_{1\rho}} = K \left[\frac{3}{2} \frac{\tau_c}{1 + 4\omega_{eff}^2 \tau_c^2} + \frac{5}{2} \frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right]$$

12.2.6 Experimentos bidimensionais no domínio do tempo

Assim como na RMN em alta resolução, também é possível realizar experimentos bidimensionais com a RMN-DT. A grande diferença entre os experimentos bidimensionais em alta resolução e no domínio do tempo é como os espectros são processados. Nos experimentos em alta resolução, normalmente se aplica a transformada de Fourier em duas dimensões. Já no domínio do tempo, o processamento dos sinais é realizado com a transformada inversa de Laplace em duas dimensões.

Atualmente, o número de experimentos bidimensionais da RMN-DT é de menos de uma dezena. Os experimentos mais usados são os que

correlacionam T_1 *versus* T_2 e T_2 *versus* difusão. Para maiores informações sobre esses experimentos e aplicações, ver Hürlimann et al. (2006)²⁶ e Song et al. (2002)²⁷.

12.3 APLICAÇÃO DA RMN DESDE A ANÁLISE OFFLINE ATÉ A INLINE

As análises físico-químicas utilizadas no setor industrial são classificadas em *offline*, *atline*, *online* e *inline*, dependendo de como e onde são feitas. As definições para esses termos podem segundo o autor. Neste capítulo, utilizaremos as definições propostas por Bonastre e colaboradores.²⁸

As análises *offline* e *atline* são caracterizadas pela necessidade de se remover a amostra da linha de produção e transportá-la manualmente até o instrumento de medida.

Nas análises *offline*, a amostra é analisada em uma instalação centralizada, com instrumentação sofisticada e geralmente automatizada. As vantagens dessa abordagem incluem a economia e a eficiência no tempo de uso dos instrumentos. A principal desvantagem é o longo tempo entre a coleta da amostra e o resultado da análise.

Na análise *atline*, o analisador é instalado próximo da linha de produção. As vantagens da análise *atline*, se comparada com a *offline*, são a rapidez da análise (quase em tempo real), o emprego de um instrumento mais simples e de menor custo, facilidade de manutenção e operação. No entanto, a instrumentação necessita ser mais robusta e normalmente se faz o monitoramento de poucos parâmetros do processo.

Na análise *online*, utiliza-se um sistema automatizado para coleta e transporte da amostra, do processo até um instrumento analítico. O processo *online* pode ser subdividido em duas categorias: o modo intermitente, ou “*stop and flow*”, em que a amostra é analisada de tempos em tempos, e o método contínuo, no qual se faz um “*by-pass*” para coleta da amostra, que flui continuamente através do instrumento.

Embora as análises *online* tenham vantagens sobre os processos *offline* e *atline*, elas requerem uma interface confiável e podem necessitar de condicionamento da amostra. A maior desvantagem das análises *online* é a necessidade de construir uma linha analítica separada, que direcione as amostras para o instrumento a uma temperatura e pressão adequadas.

Já a análise *inline* é feita *in situ*, ou seja, diretamente na linha de produção ou reator, sem necessidade de coletar amostra. Normalmente, o analisador

ou sensor fica inserido no processo (reator), o monitoramento é contínuo e usam-se sensores simples e de baixo custo.

A Tabela 12.1 apresenta um resumo das vantagens e desvantagens da aplicação dos tipos de análise físico-químicas no setor industrial.

Tabela 12.1 Vantagens e desvantagens dos tipos de análises físico-químicas utilizadas no setor industrial

| | VANTAGENS | DESvantagens |
|---------|--|---|
| Offline | Instalação central, instrumentação sofisticada, análise de muitos parâmetros | Coleta e transporte de amostra até analisador manualmente, longo tempo para resultado |
| Atline | Menor custo, instrumentação simples, mais rápida que <i>offline</i> | Coleta e transporte de amostra até analisador manualmente, monitoramento de menos parâmetros que <i>offline</i> |
| Online | Sistema automático de coleta de amostra, resultado quase instantâneo | Linha analítica separada do processo, monitoramento de menos parâmetros que <i>offline</i> e <i>atline</i> |
| Inline | Resultado instantâneo, análise do produto no processo (<i>in situ</i>) | Monitoramento de menos parâmetros que <i>offline</i> e <i>atline</i> |

Essas são definições generalizadas de categorias de análise em controle de processos industriais. Em RMN, a maioria dos autores classifica as aplicações em fluxo, como *online*, quando a amostra é transportada por meio de uma esteira (materiais sólidos, heterogêneos ou líquidos em embalagens etc.) e em tubulações, principalmente para líquidos.

A maioria das aplicações da RMN no setor industrial são *offline* ou *atline*. No modo *offline* são usados tanto aparelhos de RMN em alto campo ou alta resolução, quanto em baixo campo ou baixa resolução. No entanto, no modo *atline*, as análises são quase que exclusivamente realizadas em aparelhos de RMN em baixo campo, tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência.

12.3.1 Análises em fluxo (*online* e *inline*) por RMN

Fluxo é o escoamento de substâncias que se encontram em qualquer estado (sólido, líquido ou gasoso) e pode ser laminar ou turbulento, compressível ou incompressível, contínuo ou intermitente (*stop and flow*)²⁹. Existe também o fluxo denominado *plug flow* (fluxo em pistão), em que a amostra se move como um bloco, como, por exemplo, uma amostra sólida

transportada por uma esteira. No caso dos líquidos, isso ocorre quando a amostra é transportada homogeneamente com a ajuda de um pistão⁷.

A primeira análise em fluxo por RMN foi feita por Suryan em 1951³⁰, poucos anos após a descoberta da RMN em 1946. A amostra líquida fluía pela sonda de um espectrômetro de RMN de 25 MHz (^1H), em onda contínua, sob a força da gravidade. Ele observou um aumento do sinal em até 20 vezes, quando comparado com amostras estáticas. Esse comportamento foi relacionado a vários fatores: relaxação longitudinal (T_1), velocidade do fluxo e período no interior do campo magnético e da bobina de RF³⁰.

Singer demonstrou em 1959 a aplicação da RMN pulsada *in vivo* no estudo da velocidade do fluxo sanguíneo na cauda de ratos³¹. Um dos procedimentos foi comparar os tempos de relaxação T_1 dos prótons da água no sangue antes e após a interrupção do fluxo sanguíneo com um torniquete. Uma vez que o fluxo resulta em menos saturação, a curva de absorção com fluxo de sangue apresentou maior amplitude. O trabalho de Singer foi precursor da aplicação da RMN em fluxo sanguíneo na medicina³¹.

Em 1962, Ladner e Stacey utilizaram a RMN em fluxo contínuo para analisar a umidade de carvão com um aparelho de onda contínua de 16 MHz para ^1H ³². O fluxo, sob a força da gravidade, foi controlado a 100 g por hora, possibilitando a distinção entre os sinais derivados dos hidrogênios do material sólido (carvão) e dos hidrogênios presentes na água associada a esse material. Essa pode ser considerada a primeira aplicação da RMN em fluxo no controle de processo industriais.

Após essas aplicações iniciais, outros trabalhos foram aperfeiçoando a instrumentação e as metodologias utilizadas para medidas em fluxo. Um desses exemplos pode ser visto no trabalho de McIvor (1969), que usou um aparelho comercial de RMN em onda contínua com campo magnético B_0 de 1,4 T³³. Análises em fluxo em média resolução (largura de linha de 2 Hz a 3 Hz) permitiram a quantificação dos componentes de uma mistura de solventes com pequenas diferenças de deslocamento químico. Para fazer as medidas em fluxo, foi incorporada uma serpentina, na estrutura da sonda, a fim de aumentar o tempo de permanência da amostra no ímã antes da análise. Esse processo é conhecido como pré-magnetização e é necessário para que a amostra fique polarizada antes de entrar na bobina de RF³³. Essa configuração promoveu um aumento na razão sinal/ruído e maior precisão nas análises quantitativas.

Grover e Singer desenvolveram em 1971 as primeiras aplicações de RMN em fluxo em medicina³⁴. Eles realizaram medidas da velocidade do fluxo sanguíneo no interior do dedo humano, com a sequência de pulsos eco de

spin. Com a amplitude do eco em função do tempo de eco foi possível determinar a distribuição da velocidade do fluxo sob as condições utilizadas no experimento³⁴.

Em 1978, Watanabe e Niki desenvolveram o primeiro trabalho acoplando RMN em alta resolução em fluxo com a técnica de HPLC³⁵. Utilizaram um espectrômetro pulsado de 60 MHz para o ^1H e o método *stop and flow*.

Atualmente, sistemas hifenados de RMN–HPLC comerciais estão disponíveis em laboratórios de pesquisa e controle de qualidade, e permitiram análises com os eluentes cromatográficos em fluxo contínuo³⁶.

Pearson et al. (1987) descreveram um método *online* para análise de umidade em trigo³⁷. O método é baseado na sequência CPMG a fim de minimizar os efeitos da não homogeneidade do campo magnético, é rápido e insensível à densidade de empacotamento da amostra. No mesmo ano, Renou et al. fizeram determinações rápidas e simultâneas de etanol e açúcar em uma fermentação alcoólica³⁸.

Nicholls e De Los Santos desenvolveram em 1991 um sensor de umidade para monitorar o processo de secagem na indústria de moagem úmida de milho utilizando medidas de T_1 e T_2 ³⁹. Na configuração do sistema, um sensor de 11 MHz ^1H foi suspenso sob uma cavidade em uma calha de transporte. O sensor era preenchido com a amostra deslocando um pistão, que, após a medida, a conduzia novamente à linha de processo³⁹.

Chen et al., em 1993, estabeleceram um protocolo para a avaliação da maturidade de abacates utilizando um sensor de RMN *online* de 85 MHz para o ^1H ⁴⁰. A razão dos sinais do óleo e da água dos espectros de RMN unidimensionais e os tempos de relaxação T_1 e T_2 da água na fruta foram correlacionados com sua maturidade.

Em 1997 Zion et al. desenvolveram um sensor de RMN *online* para a identificação de azeitonas com e sem caroços. Eles acoplaram uma esteira que se movimentava a até 25 cm s^{-1} , em um espectrômetro de RMN, com ímã supercondutor, com *bore* de 30 cm de diâmetro⁴¹.

Hills e Wrigth (2006) demonstraram que a translação da amostra pode ser utilizada para adquirir os sinais de RMN, sem a necessidade do pulso de excitação ou gradiente de campo⁴². O protótipo foi baseado na inserção de um campo de RF contínuo de B_1 transversal ao campo magnético estático B_0 . O movimento da amostra foi utilizado para excitar e gerar o sinal de RMN.

Nos últimos anos, têm aumentado os esforços empregados no desenvolvimento da RMN *online/inline* de baixo custo para análises em fluxo contínuo em esteiras industriais. Muitos autores relataram que diversos fatores de qualidade em vários tipos de frutas e vegetais podem ser analisados com

RMN *online*, tais como amadurecimento, injúrias, escurecimento, infecções, quantidade de açúcar, entre outros⁴³⁻⁴⁵.

12.3.2 Desenvolvimento da RMN em fluxo no Brasil

No Brasil, os primeiros trabalhos sobre RMN-DT em fluxo ocorreram no final da década de 1990, quando foi observado que o sinal de RMN utilizava a sequência CWFP^{12,13}. Nesse trabalho, foram realizados experimentos com o escoamento laminar de água em um espectrômetro de RMN de 7,5 MHz ¹H. O sinal CWFP é muito sensível ao fluxo. A amplitude e fase de um sinal CWFP para uma amostra em fluxo dependem da velocidade e sentido do fluxo, do ângulo de *flip* e precessão e dos tempos de relaxação. Essa dependência foi demonstrada experimentalmente e teoricamente usando as equações de Bloch¹³.

Colnago et al. (2007) utilizaram a técnica de CWFP para medidas quantitativas do teor de óleo de amostras de semente em fluxo⁴⁶. Nesse experimento, as amostras passaram continuamente em uma esteira a uma velocidade de 13 cm s⁻¹, o que permitiu a análise de cerca de cem amostras em 14 segundos. Essa técnica tem potencial para a determinação do teor de óleo em mais de 20 mil sementes intactas por hora e está sendo utilizada na avaliação do teor de óleo em sementes e na seleção de material genético para a produção de biodiesel⁴⁶.

Corrêa et al., em 2009, utilizaram a dependência dos tempos de relaxação T_1 e T_2 do sinal CWFP para determinar o teor de gordura intramuscular de carne bovina no modo *stop and flow*⁴⁷. Nesse trabalho, demonstraram que o sinal obtido com a sequência CWFP possui maior correlação (0,9) com o teor de gordura do que o obtido com a sequência CPMG (0,25), que depende somente de T_2 .

Apesar de a técnica CPMG não possuir uma alta correlação com o teor de gordura intramuscular em carne bovina, ela tem alta correlação com a qualidade do óleo em sementes. Em 2007, Prestes et al. utilizaram a sequência CPMG para o desenvolvimento de um sistema automático e rápido de RMN em baixa resolução para análises qualitativas⁴⁸. Nesse trabalho, a técnica CPMG foi aplicada com a finalidade de medir a qualidade de óleo em sementes intactas para uso na produção de biodiesel. O decaimento exponencial T_2 medido com a sequência CPMG é inversamente proporcional à viscosidade do óleo nas sementes, que, por sua vez, está diretamente relacionado aos teores e tipos de ácidos graxos, entre outras propriedades⁴⁸.

Como as propriedades do biodiesel, tais como viscosidade, número de cetano e índice de iodo, são dependentes do tipo e da concentração dos ácidos graxos presentes no óleo, foi desenvolvida a aplicação da técnica CPMG para a medida desses parâmetros diretamente nas sementes. As curvas de calibração para a viscosidade e número de cetano apresentaram coeficiente de correlação de 0,94 e 0,92, respectivamente, calculados pela técnica CPMG diretamente em sementes como soja, pinhão-manso, amendoim, girassol, entre outras⁴⁸.

A Figura 12.8 apresenta os decaimentos CPMG obtidos para amostras de semente oleaginosas no modo *stop and flow*. Para esse tipo de medida a semente deve ficar imóvel, somente durante a análise (*stop and flow*), sendo possível, ainda assim, medir a qualidade do óleo em mais de mil sementes por hora.

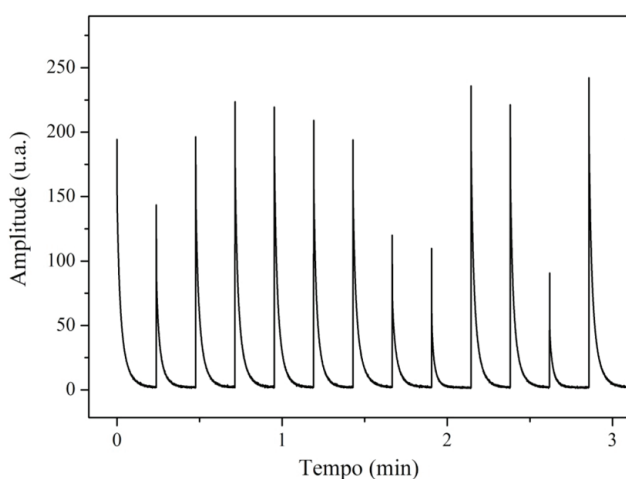


Figura 12.8 Sinal de RMN *online* obtido pela técnica CPMG de amostras de sementes oleaginosas.

Apesar do grande potencial das técnicas CPMG, tem-se encontrado alguns problemas quando aplicadas *online* e por longo período, devido a uma sobrecarga no equipamento, principalmente no amplificador de potência e na sonda detectora.

Na busca de solução para esse problema, foram desenvolvidas técnicas que utilizam, com pulsos de refocalização com ângulos menores que 180° , CPMG₉₀ e CP-CWFP. Essa prática possibilita uma economia de até 75% de

potência de RF, com redução dos problemas de superaquecimento em análises em fluxo por RMN⁴⁹.

12.4 PERSPECTIVAS

A utilização da RMN, desde os modos *offline* até *inline*, na indústria ainda encontra muitos desafios a serem superados, principalmente no que diz respeito aos problemas de implementação e custos de equipamentos. Por isso, é importante que o desenvolvimento científico e tecnológico prossiga, para tornar cada vez mais economicamente viável o uso da RMN em processos industriais. Portanto, métodos de análise por RMN, rápidos, automáticos, robustos e não destrutivos, deverão ter um grande impacto no controle de processos industriais num futuro próximo.

12.5 PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE DE ÓLEO EM SEMENTES INTACTAS POR RMN

Materiais

- Aproximadamente 15 sementes oleaginosas com diferentes teores de ácidos graxos, tais como soja, linhaça, milho, amendoim, castanha-do-Brasil, girassol, macadâmia, caju, avelã, abóbora, melancia, rabanete, maracujá, niger, gergelim, noz, pecã, entre outras. Essas sementes podem ser adquiridas em lojas de alimentos e agropecuária.

Equipamentos

- Cromatógrafo gasoso (CG), com detector de ionização de chama e coluna capilar para separação de ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês *fatty acid methyl ester* – FAME).
- Espectrômetro de RMN de baixo campo, com porta amostra de pelo menos 10 mm de diâmetro.

Métodos

- 1) Extração do óleo: as sementes oleaginosas desidratadas (5 g a 10 g) devem ser trituradas até a obtenção de um *pó bem fino*. Então, colocar o pó das

sementes em um frasco tipo Erlenmyer com aproximadamente 20 mL de hexano. O frasco lacrado deve ser agitado por 1 hora em uma capela. Em seguida, o conteúdo do frasco deverá ser filtrado e o solvente com o óleo colocado em um béquer aberto para evaporar (capela). O resíduo deve ser levado a uma estufa a 60 °C, até obtenção de peso constante.

- 2) Preparação dos FAMES: em um tubo de ensaio, colocar 35 mg do óleo a ser transesterificado, 0,5 mL de uma solução contendo 0,5 mol/L de hidróxido de sódio em metanol e aquecer por 10 minutos a 90 °C em banho-maria. Após resfriar a mistura reacional, adicionar 1,5 mL de uma mistura esterificante preparada com 2 g de cloreto de amônia, 60 mL de metanol e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, previamente mantida em refluxo, sob agitação por 15 minutos. Colocar a mistura reacional em banho-maria por 10 minutos, resfriar em banho de gelo e adicione 5,0 mL de n-heptano e 10 mL de água destilada. Agitar o tubo por alguns minutos e aguardar a ocorrência da separação de fases. Retirar a fase orgânica (superior) que contém os FAMES.
- 3) Análise dos FAME por GC: usar um volume de injeção de cerca de 1 µL da solução em n-heptano preparado na reação de transesterificação, hidrogênio como gás de arraste, com velocidade linear média de cerca de 31 cm/s e nitrogênio como gás auxiliar com aproximadamente 2 mL/min. Usar a temperatura do injetor e detector de 250 °C, temperatura inicial do forno de 60 °C por 8 minutos, com taxa de aquecimento de 8 °C/min até 220 °C, mantendo a esta temperatura até o final da análise. Utilize uma coluna capilar de sílica fundida LM-100 (Carbowax 20M, polietileno glicol) ou equivalente, com 30 m de comprimento. A quantificação dos FAME é realizada pela normalização (100%) da área dos picos cromatográficos.
- 4) Cálculo do índice de iodo, número de cetano e viscosidade do óleo a partir do teor de FAMES (CG): o índice de iodo (II), número de cetano (CN) e viscosidade (μ) são calculados pelas equações de 12.13 a 12.15, respectivamente.

$$\text{(Equação 12.13)} \quad IV = \sum \frac{254 \times D \times A_i}{MW_i}$$

$$\text{(Equação 12.14)} \quad \ln \mu_0 = \sum_{i=1}^n y_i \ln \mu_i$$

$$\text{(Equação 12.15)} \quad CN = \frac{46,3 + 5458}{SN - 0,225 \times IV}$$

em que D é o número de ligações duplas, A_i é a porcentagem de cada FAME determinado por CG, MW_i é a massa molecular de cada FAME, μ_i e μ_0 a viscosidade cinemática a 40 °C de cada FAME e da mistura de FAMES, respectivamente; y_i é $A_i/100$ e SN é $\Sigma(560 \times A_i)/MW$. Os valores da viscosidade podem ser obtidos em Prestes et al. (2007)⁴⁸.

- 5) Análise das sementes por RMN: após calibrar os pulso de 90°, usar uma sequência CPMG, com tempo de eco de 0,2 ms, 600 ecos, tempo de reciclagem de 1 segundo, e adquirir 16 espectros por amostra. Em seguida, ajustar a fase da componente real do espectro, que será usada nas análises multivariadas.
- 6) Curva de calibração por regressão dos mínimos quadrados parciais (partial least squares – PLS): para a determinação da qualidade do óleo em termos de índice de iodo (II), número de cetano (CN) e viscosidade (μ), é necessário construir uma curva de calibração entre os valores determinados a partir dos dados cromatográficos, das equações 12.13 a 12.15 e os respectivos dados de RMN (600 dados do decaimento CPMG). Para obter a curva de calibração, utilizar um programa de análise multivariada, com PLS. Os dados de CPMG são agrupados em uma matriz de 600 variáveis (variável independente) de cada uma das amostras, enquanto os dados da concentração dos FAMES são agrupados em uma matriz com a porcentagem de cada FAME para cada amostra (variável dependente). A *performance* da curva de calibração pode ser obtida realizando uma validação cruzada entre os dados obtido por cromatografia e os dados previstos por RMN. Com a curva de calibração para cada parâmetro de qualidade é possível prever esses mesmos parâmetros de qualidade do óleo em sementes intactas (amostras desconhecidas), a partir dos dados de RMN, obtidos com a sequência CPMG.

REFERÊNCIAS

1. Levitt MH. Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance. 2 ed. Chichester: John Wiley and Sons; 2009.
2. Abragam A. The principle of nuclear magnetism. Oxford: Clarendon Press; 1978.
3. Ernst RR, Bodenhausen G, Wokaun A. Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions. Oxford: Clarendon Press; 1990.
4. Farrar TC, Becker ED. Pulse and Fourier transform NMR: introduction to theory and methods. New York/London: Academic Press; 1971.
5. Colnago LA, Andrade FD, Souza AA, Azeredo RBdV, Lima AA, Cerioni LM, et al. Why is inline NMR rarely used as sensor in factory floor? Challenges and opportunities. Chem Eng Technol. 2014 Feb;37(2):191-203.
6. Gil VMS, Geraldies CFGC. Ressonância Magnética Nuclear: fundamentos, métodos e aplicações. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1987.
7. Nordon A, McGill CA, Littlejohn D. Process NMR spectrometry. Analyst. 2001;126(2):260-72.
8. Pedersen HT, Munck L, Engelsen SB. Low-field (1)H nuclear magnetic resonance and chemometrics combined for simultaneous determination of water, oil, and protein contents in oilseeds. Journal of the American Oil Chemists Society. 2000;77(10):1069-76.
9. Meiboom S, Gill D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. Review of Scientific Instruments. 1958;29(8):688-91.
10. Carr HY, Purcell EM. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. Physical Review. 1954;94(3):630-38.
11. Venancio T, Engelsberg M, Azeredo RBV, Alem NER, Colnago LA. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. Journal of Magnetic Resonance. 2005;173(1):34-9.
12. Azeredo RBV. Espectroscopia de RMN CWFP [Tese de Doutorado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2004.
13. Azeredo RBD, Engelsberg M, Colnago LA. Flow sensitivity and coherence in steady-state free spin precession. Physical Review. E 2001;64(1):16309-13.
14. de Andrade FD, Netto AM, Colnago LA. Use of Carr-Purcell pulse sequence with low refocusing flip angle to measure T-1 and T-2 in a single experiment. Journal of Magnetic Resonance. 2012;214:184-8.
15. Maus A, Hertlein C, Saalwächter K. A robust proton NMR method to investigate hard/soft ratios, crystallinity and component mobility in polymers. Macromol Chem Phys. 2006;207:1150-8.
16. Kimmich R, Fatkullin N. Polymer chain dynamics and NMR. Berlin/Heidelberg: Springer; 2004.

17. Clauss J, Schmidt-Rohr K, Spiess HW. Determination of domain sizes in heterogeneous polymers by solid-state NMR. *Acta Polym.* 1993;44(1):1-7.
18. Saalwachter K. Proton multiple-quantum NMR for the study of chain dynamics and structural constraints in polymeric soft materials. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2007;51:243-71.
19. Saalwachter K, Heuer A. Chain dynamics in elastomers as investigated by proton multiple-quantum NMR. *Macromolecules.* 2006;39:3291-303.
20. Saalwachter K. Detection of heterogeneities in dry and swollen polymer networks by proton low-field NMR spectroscopy. *Am Chem Soc.* 2003;125:14684-5.
21. Goldman M, Shen L. Spin-Spin Relaxation in LaF₃. *Phys Rev.* 1966;144:321-31.
22. Gaborieau M, Graf R, Spiess HW. Versatility of the dipolar filter selection: From ¹H nuclear spin diffusion experiment to the measurement of nuclear Overhauser effect in homopolymer melts. *Solid State Nucl Magn Reson.* 2005;28:160-72.
23. Buda A, Demco DE, Bertmer B, Blumich B, Reining B, Keul H, et al. Domain sizes in heterogeneous polymers by spin diffusion using single-quantum and double-quantum dipolar filters. *Solid State Nucl Magn Reson.* 2003;24:39-67.
24. Duer M. *Solid-State NMR Spectroscopy*. 1st ed. Oxford: Blackwell; 2004.
25. Grohn H. A study of T₁ Relaxation: From Relaxation Mechanisms to the Magnetic Resonance Imaging Contrast [Doctorate]. Joensuu: Kuopio University; 2003.
26. Hürlimann MD, Burcaw L, Song Y-Q. Quantitative characterization of food products by two-dimensional D-T₂ and T₁-T₂ distribution functions in a static gradient. *J. Colloid Interf Sci.* 2006;297(1):303-11.
27. Song Y-Q, Venkataramanan L, Hürlimann MD, Flaum M, Frulla P, Straley C. T₁-T₂ Correlation Spectra Obtained Using a Fast Two-Dimensional Laplace Inversion. *J Magn Res.* 2002;154(2):261-8.
28. Bonastre A, Ors R, Capella JV, Fabra MJ, Peris M. In-line chemical analysis of wastewater: Present and future trends. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2005;24(2):128-37.
29. Fox RW, Macdonald AT. *Introdução à mecânica dos fluidos*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara S. A.; 1985.
30. Suryan G. Nuclear resonance in flowing liquids. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Section A.* 1951;33(2):107-11.
31. Singer JR. Blood Flow Rates by Nuclear Magnetic Resonance Measurements. *Science.* 1959;130(3389):1652-3.
32. Ladner WR, Stacey AE. Measurement of Moisture in a Moving Coal Feed. *British Journal of Applied Physics.* 1962;13(3):136.
33. McIvor MC. A Flow Probe for Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Physics E-Scientific Instruments.* 1969;2(3):292-3.

34. Grover T, Singer JR. Nmr Spin-Echo Flow Measurements. *Journal of Applied Physics*. 1971;42(3):938-40.
35. Watanabe N, Niki E. Direct-Coupling of Ft-Nmr to High-Performance Liquid-Chromatography. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*. 1978;54(4):194-9.
36. Tellier C, Mariette F. On-line Applications in Food Science. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. In: G.A. Webb PSBaMJM, editor. V. 31. New York/London: Academic Press; 1995. p. 105-22.
37. Pearson RM, Ream LR, Job C, Adams J. The Use of Small Nuclear-Magnetic-Resonance Spectrometers for Online Process-Control. *Cereal Foods World*. 1987;32(11):822-6.
38. Renou JP, Briguet A, Gatellier P, Kopp J. Determination of Fat and Water Ratios in Meat-Products by High-Resolution Nmr at 19.6 Mhz. *International Journal of Food Science and Technology*. 1987;22(2):169-72.
39. Nicholls CI, Santos AD. Hydrogen Transient Nuclear-Magnetic-Resonance for Industrial Moisture Sensing. *Drying Technology*. 1991;9(4):849-73.
40. Chen P, McCarthy MJ, Kauten R, Sarig Y, Han S. Maturity Evaluation of Avocados by Nmr Methods. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 1993;55(3):177-87.
41. Zion B, Kim SM, McCarthy MJ, Chen P. Detection of pits in olives under motion by nuclear magnetic resonance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997;75(4):496-502.
42. Hills BP, Wright KM. Motional relativity and industrial NMR sensors. *Journal of Magnetic Resonance*. 2006;178(2):193-205.
43. Hills BP, Clark CJ. Quality Assessment of Horticultural Products by NMR. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. V. 50. New York/London: Academic Press; 2003. p. 75-120.
44. Tu SS, Choi YJ, McCarthy MJ, McCarthy KL. Tomato quality evaluation by peak force and NMR spin-spin relaxation time. *Postharvest Biology and Technology*. 2007;44(2):157-64.
45. Hernández-Sánchez N, Hills BP, Barreiro P, Marigheto N. An NMR study on internal browning in pears. *Postharvest Biology and Technology*. 2007;44(3):260-70.
46. Colnago LA, Engelsberg M, Souza AA, Barbosa LL. High-throughput, non-destructive determination of oil content in intact seeds by continuous wave-free precession NMR. *Analytical Chemistry*. 2007;79(3):1271-4.
47. Correa CC, Forato LA, Colnago LA. High-throughput non-destructive nuclear magnetic resonance method to measure intramuscular fat content in beef. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009;393(4):1357-60.

48. Prestes RA, Colnago LA, Forato LA, Vizzotto L, Novotny EH, Carrilho E. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. *Analytica Chimica Acta*. 2007;596(2):325-9.
49. de Andrade FD, Netto AM, Colnago LA. Qualitative analysis by online nuclear magnetic resonance using Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence with low refocusing flip angles. *Talanta*. 2011;84(1):84-8.

13

CAPÍTULO

PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES CATALISADA POR LIPASES: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

José André Cavalcanti da Silva
Denise Maria Guimarães Freire

13.1 INTRODUÇÃO

Os biolubrificantes são lubrificantes biodegradáveis obtidos, em geral, a partir de óleos vegetais, e são utilizados em aplicações nas quais a possibilidade de vazamentos possa comprometer o meio ambiente. O mercado mundial de lubrificantes acabados é da ordem de 35 milhões de toneladas por ano¹, com os biolubrificantes representando cerca de 1% desse total². Enquanto o mercado de lubrificantes acabados de base mineral se encontra estagnado, os biolubrificantes vêm apresentando um crescimento médio de 10% ao ano nos últimos dez anos³.

A oleoquímica, no que diz respeito ao desenvolvimento de lubrificantes de origem vegetal, representa um dos principais elementos que constituem o grande desafio representado pela química dos bioprodutos. Todas as tecnologias necessárias para esmagamento das sementes, refino do óleo,

fracionamento e transformação química já estão disponíveis e conhecidas, devido ao fato de serem as mesmas utilizadas em tecnologia dos alimentos. Geralmente, o sistema industrial é organizado de tal forma que quatro unidades de processamento (esmagamento, refino, fracionamento e transformação química) são conduzidas de forma independente. Esse tipo de organização permite uma grande flexibilidade e uma maior economia de escala. Porém, é justamente na etapa de transformação química que se localizam os maiores desafios para a produção de lubrificantes biodegradáveis⁴.

Os lubrificantes, de uma forma geral, devem apresentar certas propriedades físico-químicas dentro de determinadas especificações, como por exemplo: viscosidade, índice de acidez, corrosividade, ponto de fluidez etc. No caso dos biolubrificantes, geralmente constituídos por ésteres orgânicos, as estabilidades oxidativa, térmica e hidrolítica são essenciais, sendo a primeira uma das propriedades mais importantes no desenvolvimento de um lubrificante biodegradável. Entretanto, à medida que se sintetiza uma molécula altamente resistente à oxidação, com as duplas ligações removidas ou protegidas por impedimentos estéricos, deve-se levar em consideração que a ação dos micro-organismos responsáveis pela sua biodegradação também será dificultada. Assim, o grande desafio a ser suplantado nessa área reside no fato de se encontrar um equilíbrio, ou seja, a síntese de novos biolubrificantes que tenham alta resistência à oxidação e sejam biodegradáveis⁵.

13.2 HISTÓRICO

Os primeiros óleos lubrificantes utilizados pelos seres humanos foram os óleos de origem animal e vegetal. No século XIX, triglicerídeos naturais foram gradualmente substituídos por lubrificantes derivados do petróleo, denominados óleos minerais. Esses últimos, por sua vez, estão sendo substituídos por óleos sintéticos (obtidos por meio de reações químicas) devido aos padrões de qualidade cada vez mais rigorosos, nem sempre alcançados pelos óleos minerais convencionais, e aos requisitos mais restritos, impostos por legislações ambientais⁶.

Segundo Lämsä⁷, o desenvolvimento dos ésteres sintéticos para uso como lubrificantes teve início na década de 1930, nos Estados Unidos e na Alemanha. Neste último país, deveu-se, principalmente, à Segunda Guerra Mundial e ao déficit na produção de petróleo. Foram desenvolvidos na Alemanha diésteres e poliolésteres, sendo utilizados, primeiramente, como lubrificantes de turbinas de aviões. Seus benefícios eram boas propriedades a baixas

temperaturas e resistência à oxidação térmica. Desde 1960, a indústria aeronáutica tem utilizado neopentil-poliolésteres como lubrificantes para motores de jatos. Sua característica importante reside na flexibilidade em relação às propriedades físicas e químicas, obtidas por meio de mudanças na estrutura química das matérias-primas, como comprimento da cadeia, ramificação, número de átomos de carbono e tipo de álcool utilizado na síntese.

Nos anos 1960, ésteres sintéticos para lubrificantes foram desenvolvidos para condições árticas, funcionando como óleos de motor, transmissão e engrenagens, além de fluidos hidráulicos e graxas. Nos anos 1970, vieram os óleos para motores automotivos, a começar pelos óleos semissintéticos, incluindo diésteres. Os principais benefícios foram boas propriedades a baixas temperaturas e baixa volatilidade. O primeiro óleo de motor sintético contendo ésteres foi lançado em 1977, sendo constituído principalmente por polialfaolefinas. O primeiro óleo de motor náutico dois tempos baseado em ésteres sintéticos foi lançado em 1982 na Suíça e no sul da Alemanha. O fluido base principal era o neopentil-polioléster de ácidos graxos ramificados⁷. Na Figura 13.1 estão ilustradas as estruturas moleculares de alguns desses óleos sintéticos.

As primeiras leis sobre lubrificantes biodegradáveis foram publicadas em Portugal em 1991 pelo Ministério de Meio Ambiente. Elas obrigavam o uso desses lubrificantes em óleos de motores náuticos dois tempos, cuja biodegradabilidade deveria ser de no mínimo 66%, de acordo com o teste CEC-L-33-T-82. Esse teste, desenvolvido pela Co-Ordinating European Council (CEC), foi o primeiro para determinação da biodegradação de lubrificantes. Ele se baseia na determinação da biodegradabilidade primária dos óleos lubrificantes, por meio da utilização de equipamento infravermelho para detecção de mudanças em propriedades físico-químicas desses óleos por ação de micro-organismos. Testes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) também têm sido utilizados desde o início dos anos 1990⁷. Atualmente, os métodos mais utilizados para medir a biodegradabilidade relativa de lubrificantes são o OCDE 301 B e o CEC-L-103-12.

A etapa seguinte, a partir dos óleos para motor dois tempos, foi o desenvolvimento de óleos biodegradáveis para motosserras, lançados em meados da década de 1980. Os primeiros produtos eram baseados em ésteres naturais, triglicerídeos de óleo de canola. A partir dessa década, surgiram outras aplicações para esses produtos, sendo as principais: fluidos hidráulicos, fluidos de corte, óleos para rolamentos, óleos de turbina, óleos para engrenagens industriais e óleos para compressores. Outras áreas de aplicação são indústrias de cosméticos, têxteis e fibras, líquidos de troca térmica

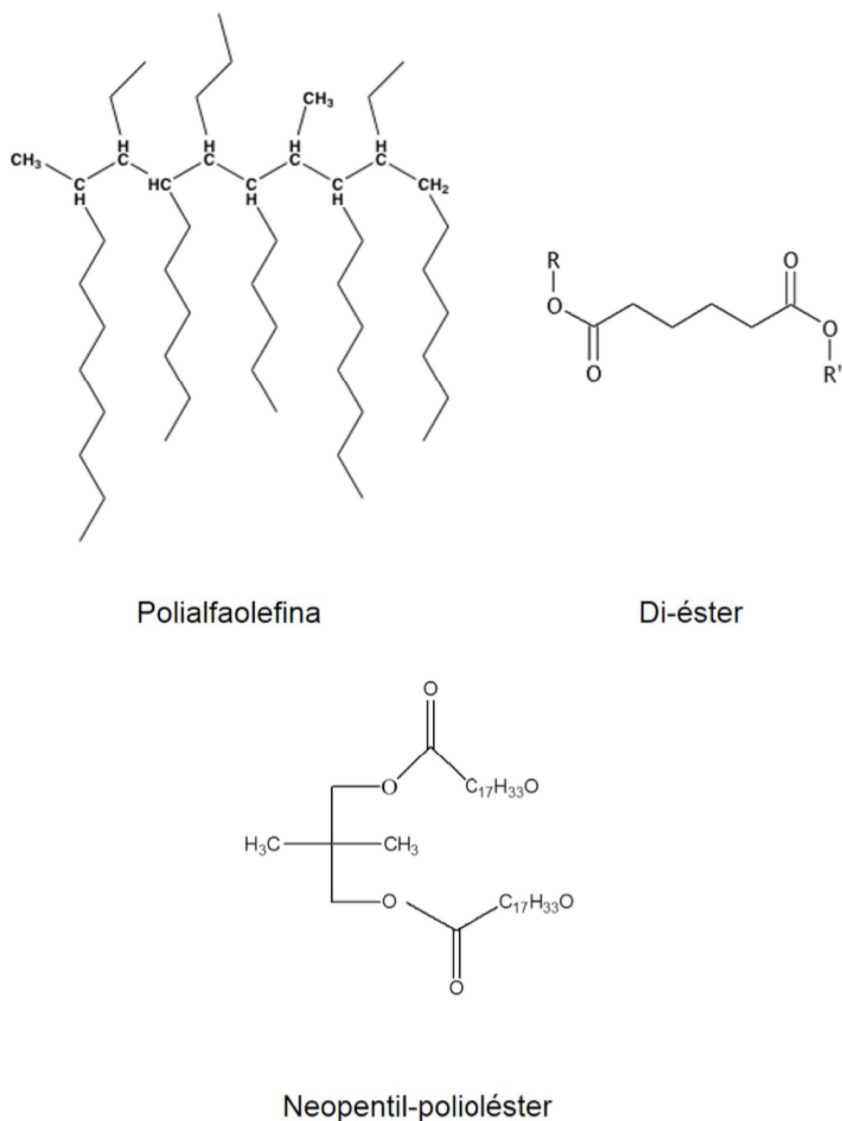


Figura 13.1 Estruturas moleculares de alguns óleos sintéticos.

e indústrias de plásticos. Os ácidos graxos para os ésteres sintéticos eram oriundos de óleos vegetais ou de gordura animal. Ácidos graxos puros ou parcialmente purificados eram obtidos a partir de fracionamento, destilação, craqueamento, desparafinação, etc. Já os álcoois podem variar de alcanóis

de cadeia curta até polióis. Em 1989, foi desenvolvido o primeiro óleo de turbina baseado em trimetilolpropano e monoeritrol⁷.

Nos anos 1990, várias companhias americanas seguiram a tendência, já existente na Europa, de adequação às regulações ambientais⁸. Entre elas se destaca a Lubrizol Co, de Ohio, a qual investiu muitos recursos em pesquisa e desenvolvimento para criar uma série de aditivos altamente efetivos, obtidos a partir de óleo de girassol com alto teor de ácido oleico. Nessa mesma época, foi criado o centro de pesquisas especializado em biolubrificantes da University of Northern Iowa, o National Ag-Based Lubricants Center (NABL), resultando no desenvolvimento e patente do primeiro fluido hidráulico de trator com base em óleo de soja.

13.3 LUBRIFICANTES E BIOLUBRIFICANTES

13.3.1 Lubrificantes

O termo óleo se refere a uma ampla variedade de materiais líquidos com diferentes propriedades, utilizados, comumente, na moderna tecnologia de equipamentos. Entre esses líquidos se destacam os óleos lubrificantes. Os óleos básicos são os constituintes de maior proporção na formulação dos óleos lubrificantes, e são obtidos, em geral, por meio do processamento do petróleo. Eles podem ser classificados, primariamente, como minerais ou sintéticos, em função da fonte ou do processo pelo qual são produzidos⁹. Em diversas aplicações dos óleos lubrificantes, os padrões de qualidade exigidos (como graus de viscosidade, resistência à oxidação, ponto de fluidez), cada vez mais rigorosos, nem sempre podem ser alcançados com o uso dos óleos minerais convencionais. Assim sendo, rotas alternativas de produção de óleos minerais vêm sendo desenvolvidas para a obtenção de produtos com maior durabilidade e menor impacto ambiental.

Os óleos minerais são obtidos por meio da destilação e do refino do petróleo, sendo classificados como parafínicos ou naftênicos, dependendo do tipo de hidrocarboneto predominante em sua composição. Estes possuem em média 20 a 50 átomos de carbono por molécula, as quais podem ser de cadeias parafínicas (alcanos lineares ou ramificados), naftênicas (cicloalcanos com cadeias laterais) ou aromáticas (principalmente alquil-benzenos)¹⁰.

Os óleos básicos parafínicos apresentam alto ponto de fluidez e elevado índice de viscosidade (IV, propriedade que mede a variação da viscosidade

com a temperatura). Em seu processo de produção, a etapa de desparafinação é indispensável, e o produto, mesmo desparafinado, ainda precisa ser aditivado com um abaixador de ponto de fluidez para evitar o crescimento dos cristais de parafinas em baixas temperaturas, reduzindo, assim, a temperatura de escoamento do produto.

Já os óleos de características naftênicas apresentam teores relativamente mais altos (do que os parafínicos) de carbonos em cadeias cíclicas (naftênicas). O corte de um cru naftênico apresenta teores muito baixos de parafinas lineares e não precisa ser desparafinado. Seu ponto de fluidez pode chegar a $-51\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por outro lado, apresenta valores baixos de IV (índice de viscosidade), o que torna difícil a sua aplicação na formulação de óleos para motores, sendo mais utilizado nas formulações de óleos de corte, óleos para amortecedores e como óleo isolante para transformadores elétricos. Os óleos de característica aromática encontram aplicações como óleos extensores na indústria de borracha¹¹.

Os óleos básicos minerais podem ser também classificados pelo tipo de processo de obtenção. O mais tradicional é a extração por solventes, chamado de processo convencional, no qual compostos indesejáveis como os poliaromáticos e os compostos contendo heteroátomos, como o nitrogênio e o enxofre, são removidos, aumentando-se o índice de viscosidade e melhorando-se a estabilidade dos produtos. Esse processo também inclui etapas de desparafinação, utilizada para enquadrar o ponto de fluidez, e de hidroacabamento para o enquadramento final do produto nas especificações. O processo chamado de não convencional inclui etapas mais severas de hidro-craqueamento, nas quais as moléculas são craqueadas, saturadas e isomerizadas, obtendo-se produtos de elevada estabilidade e índice de viscosidade¹¹.

Por outro lado, os óleos básicos sintéticos são produzidos por meio de reações químicas em que se busca obter produtos com propriedades adequadas às funções lubrificantes. Cerca de 80% do mercado mundial de lubrificantes sintéticos é composto por polialfaolefinas (45%), ésteres orgânicos (25%) e poliglicóis (10%)¹². Dentre os básicos sintéticos empregados, o de maior uso é a polialfaolefina, e, em geral, os básicos sintéticos têm como vantagens sobre os básicos minerais as maiores estabilidades térmica e oxidativa, melhores propriedades a baixas temperaturas e menor volatilidade. Em contrapartida, os básicos minerais apresentam menor custo comparativamente aos sintéticos.

Nas aplicações em que se necessita que o produto apresente um elevado nível de biodegradabilidade, esse requisito só pode ser atingido por meio do uso de bases sintéticas de origem vegetal.

Com relação aos óleos automotivos, o American Petroleum Institute (API), classifica os óleos básicos em cinco categorias, conforme ilustrado na Tabela 13.1.

Tabela 13.1 Classificação API dos óleos básicos

| CATEGORIA | SATURADOS ¹ | | ENXOFRE, %P (²) | ÍNDICE DE VISCOSIDADE³ |
|-----------|---|------|-----------------|------------------------|
| Grupo I | < 90 | e/ou | > 0,03 | 80 a 120 |
| Grupo II | ≥ 90 | e | ≤ 0,03 | 80 a 120 |
| Grupo III | ≥ 90 | e | ≤ 0,03 | > 120 |
| Grupo IV | Polialfaolefinas (PAO) | | | |
| Grupo V | Outros óleos básicos não incluídos nos grupos I, II, III e IV | | | |

Fonte: ¹³.

Legenda: ⁽¹⁾ ASTM D 2007; ⁽²⁾ ASTM D 2622 ou ASTM D 4294 ou ASTM D 4927 ou ASTM D 3120; ⁽³⁾ ASTM D 2270.

O desempenho dos lubrificantes é avaliado por sua habilidade de reduzir o atrito, resistir à oxidação, minimizar a formação de depósitos e impedir a corrosão e o desgaste. A maioria dos problemas associados aos lubrificantes está relacionada à degradação do óleo e à sua contaminação com os subprodutos da combustão no cárter (automotivos). Para minimizar tais inconvenientes, os óleos lubrificantes são obtidos por meio da mistura de óleos básicos e aditivos com funções antioxidante, antidesgaste, detergente/dispersante, dentre outras. Desse modo, projetar um lubrificante para executar estas funções é uma tarefa complexa, que envolve uma avaliação cuidadosa das propriedades do óleo básico e dos aditivos que serão empregados.

13.3.2 Biolubrificantes

Um biolubrificante é um lubrificante biodegradável que possui a capacidade comprovada de ser decomposto, por ação microbiana, em um determinado intervalo de tempo.

Em termos gerais, biodegradabilidade significa a tendência de um lubrificante ser metabolizado por micro-organismos em até um ano. Quando ela é completa, significa que o lubrificante retornou essencialmente à natureza,

e quando é dita parcial, indica que um ou mais componentes do lubrificante não são degradáveis².

A biodegradabilidade resulta em autodecomposição por meio de micro-organismos em produtos não tóxicos (CO₂ e água). A forma pela qual os micro-organismos executam isso depende largamente das suas estruturas. A maior parte dos fluidos hidráulicos com base vegetal é prontamente biodegradável. Os óleos vegetais são tipicamente 99% biodegradáveis, caindo, usualmente, para 90% a 98% após a mistura com aditivos. Por outro lado, a biodegradabilidade dos óleos minerais é de apenas 20%¹⁴.

As normas e padrões de biodegradabilidade e toxicidade são diferentes para cada país. Por exemplo, na Alemanha as especificações para lubrificantes biodegradáveis são bem mais rigorosas do que na Suíça. Durante vários anos, a American Society for Testing and Materials (ASTM) esteve envolvida na definição do termo biodegradabilidade, uma vez que este era o foco principal desses produtos. A ênfase em compatibilidade ambiental significava um menor foco nos aspectos econômicos desses produtos, e, em alguns casos, no seu desempenho. Como resultado, os primeiros produtos apresentaram custo elevado e/ou baixo desempenho. Mesmo assim, ainda encontravam um nicho de mercado. No final dos anos 1990, entretanto, muitas companhias americanas reduziram ou eliminaram os seus projetos “verdes”, e as pesquisas continuaram apenas em laboratórios acadêmicos e governamentais.

A tecnologia inicial para biolubrificantes foi baseada em óleos vegetais, os quais foram submetidos a poucos tratamentos químicos e aos quais foram adicionados aditivos para aumento de desempenho. Talvez o mais importante desenvolvimento para os biolubrificantes norte-americanos tenha sido a introdução da soja com alto teor de ácido oleico pela Dupont Co., no início dos anos 1990. O óleo dessa soja geneticamente modificada tinha um perfil de ácidos graxos consideravelmente superior ao dos óleos de soja convencionais (mais rico em ácido oleico)⁸. Originalmente projetado para óleo de fritura, esse óleo mostrou uma estabilidade oxidativa aproximadamente 27 vezes maior do que a do óleo de soja convencional. Essa característica colaborou para o desenvolvimento bem-sucedido de um grande número de lubrificantes e graxas⁸.

Apesar de óleos com alto teor de ácido oleico solucionarem, na maioria dos casos, o problema da estabilidade oxidativa, muitos desses produtos necessitavam ser misturados com outros óleos (em geral, sintéticos) para melhorar o seu ponto de fluidez. Além disso, no caso de lubrificantes utilizados em aplicações externas, havia a necessidade de misturá-los com vários ésteres de elevado custo, os quais algumas vezes afetam de forma negativa a

compatibilidade do produto final com os elastômeros (presentes nas juntas de vedação do equipamento a ser lubrificado). Como consequência, têm ocorrido desenvolvimentos recentes, incluindo a criação de óleos vegetais modificados quimicamente, os quais permitem uma maior flexibilidade no uso de qualquer óleo vegetal como base, além de melhorar o desempenho tanto em termos de oxidação quanto em estabilidade ou fluidez a baixas temperaturas. Os “estolides” (Figura 13.2) são um exemplo dessas novas tecnologias de transformação química. Esses compostos, criados por meio da ligação química de diferentes ácidos graxos insaturados, apresentaram baixos pontos de fluidez ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) e alta estabilidade oxidativa no ensaio *rotary pressure vessel oxidation time* (RPVOT) (200 a 400 minutos)⁸. Esse ensaio, também chamado de bomba rotatória, permite a avaliação da estabilidade oxidativa de um lubrificante por meio da medição do consumo de oxigênio de uma amostra do mesmo, quando submetida a uma temperatura de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ na presença de um catalisador de cobre.

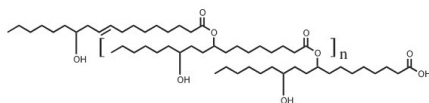


Figura 13.2 Molécula genérica de um “estolide”.

A popularidade dos biocombustíveis nos últimos anos tem resultado em um investimento significativo de capital público e privado no desenvolvimento de oleaginosas¹⁵. Apesar das diferenças no uso final, muitas das oleaginosas e dos processos desenvolvidos para biocombustíveis têm aplicações em biolubrificantes.

A demanda por lubrificantes biodegradáveis está relacionada a uma conscientização crescente quanto ao impacto das tecnologias sobre o meio ambiente. Essa conscientização está ocorrendo tanto como um resultado de uma combinação de regulações locais e nacionais quanto como pela influência dos consumidores. Países europeus, especificamente Alemanha, Áustria e os países da Escandinávia, têm conduzido grandes esforços nessa área.

Há um grande esforço na Europa no sentido de se explorar materiais de origem agrícola. A Rede Interativa para Culturas Agrícolas e Aplicações (Interactive European Network for Industrial Crops and their Applications – IENICA) é composta por 14 países com o objetivo de criar uma sinergia com

a indústria de culturas agroindustriais da União Europeia, desenvolvendo oportunidades científicas, industriais e de mercado para aplicações dessas culturas⁸. Uma das principais áreas de aplicação atendidas por esses esforços é a de lubrificantes. A natureza ambientalmente compatível dos lubrificantes com base em óleos vegetais e seus benefícios de marketing têm provocado o envolvimento de várias companhias nesse mercado. Por exemplo, a Mobil Chemical implementou uma linha limpa de produção de lubrificantes como parte do programa Agricultura para Química e Energia (Agriculture pour la Chimie et L'Energie – AGRICE). A Shell e a British Petroleum firmaram um acordo com a Société Nationale des Chemins de Fer (SNCF, companhia de trens da França) para o desenvolvimento de lubrificantes biodegradáveis. Esforços adicionais foram feitos no desenvolvimento de aplicações de óleos vegetais na desmoldagem de concreto. Em 2002, o mercado total de lubrificantes da Europa Ocidental era de 5.020.000 t/ano, das quais 50.000 t/ano eram baseadas em óleos vegetais. Por outro lado, o mercado norte-americano de lubrificantes é de 8.250.000 t/ano e apenas 25.000 t/ano são baseadas em óleos vegetais⁸.

Os óleos vegetais já são utilizados como lubrificantes, devido à sua lubrificidade superior, boas propriedades anticorrosivas, melhores características viscosidade-temperatura e baixa evaporação, em aplicações industriais como enrolamentos, cortes, desenhos e operações de “*quenching*”, tanto puros como em mistura com óleos minerais. Além disso, esses óleos são prontamente biodegradáveis e ambientalmente seguros, quando comparados aos óleos minerais, devido aos ácidos graxos em sua composição. Algumas outras vantagens dos óleos vegetais incluem o fato de serem obtidos de fontes renováveis e de não apresentarem dependência de óleos importados de outros países. Do ponto de vista ambiental, a importância deles é evidente, sobretudo em áreas de lubrificação com perda total, aplicações militares e em atividades ao ar livre, como áreas florestais, mineração, estradas de ferro, pesca, escavações e sistemas hidráulicos agrícolas. Entretanto, o uso extensivo de óleos vegetais é restrito devido ao seu desempenho ineficiente a baixas temperaturas e baixas estabilidades hidrolítica e termo-oxidativa, as quais podem ser mitigadas por meio de modificações na estrutura do óleo¹⁶.

Óleos básicos sintéticos oferecem melhores características de estabilidade e desempenho do que óleos minerais. A maioria dos óleos sintéticos biodegradáveis são ésteres químicos que oferecem estabilidades térmica e oxidativa superiores. Os preços para esse nicho de produtos são maiores do que os dos óleos vegetais e significativamente maiores do que os dos lubrificantes de base mineral. Apesar do custo dos lubrificantes com base em óleos

vegetais ser maior do que o dos de base mineral, vantagens ambientais em curto, médio e longo prazo podem balancear essa diferença. Além disso, a opção de utilização de biolubrificantes pode contribuir para a melhora da imagem pública das companhias (ISO 14000), e, assim, abre-se a possibilidade da conquista de novos mercados^{17,18}.

13.3.3 Obtenção dos biolubrificantes via catálise química

Na produção de ésteres simples a partir de álcoois de cadeia curta, como metanol, etanol ou butanol e triglicerídeos de origem natural, os catalisadores mais utilizados são hidróxido de sódio ou potássio, hidróxidos e alcóxidos de metais, carbonatos, acetatos e diferentes ácidos, por meio de reações de esterificação (Figura 13.3) ou transesterificação (Figura 13.4). Uma produção viável economicamente de monoésteres em escala industrial deve atender, no mínimo, aos seguintes critérios: bom rendimento, poucos subprodutos, balanço energético favorável, pequeno impacto no meio ambiente e simplicidade. Entretanto, apenas poucos dentre os inúmeros processos publicados na literatura especializada, de fato, atendem a esses requisitos⁷.

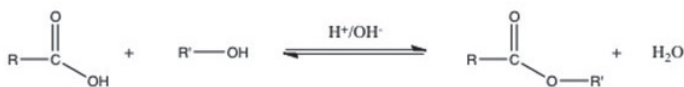


Figura 13.3 Reação de esterificação de um ácido carboxílico com um álcool.

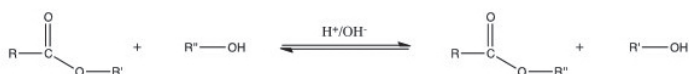


Figura 13.4 Reação de transesterificação de um éster com um álcool.

Os principais tipos de ésteres utilizados como biolubrificantes são: diésteres, ftalatos, trimelilatos, C₃₆ dimeratos e ésteres de poliol ou poliolésteres (Figura 13.5).

Os diésteres são produzidos pela reação química entre dois álcoois monohídricos e um ácido dicarboxílico ou um diol e um ácido monocarboxílico. Por

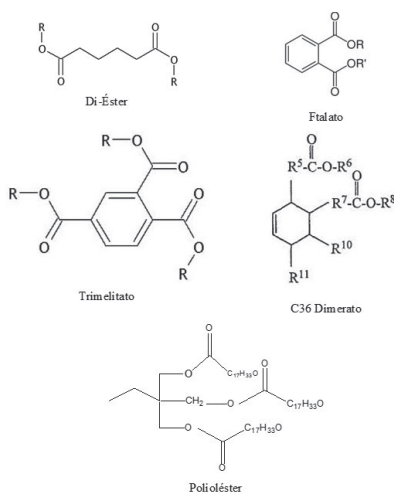


Figura 13.5 Estruturas dos ésteres mais utilizados como biolubrificantes.

exemplo, os ácidos azelaico, sebáico e málico são bastante utilizados como diácidos. Já os álcoois mais utilizados são 2-etilhexanol, álcool iso-tridecílico e uma mistura de álcoois de C8 a C10. Os diésteres são utilizados em turbinas a gás, compressores, fluidos hidráulicos e óleos de motor dois tempos. Os primeiros lubrificantes utilizados em turbinas a gás foram os dioctilsebacatos. Em seguida, estes foram substituídos por azelatos e adipatos, e, mais recentemente, por poliolésteres. Os diésteres apresentam excelentes propriedades a baixas temperaturas e alto índice de viscosidade⁷.

Os poliolésteres são produzidos na reação entre álcoois poli-hídricos e ácidos mono ou dicarboxílicos. Eles também são denominados ésteres impedidos e são utilizados em turbinas de aviões e na formulação de óleos para motores automotivos. Essa classe de produtos oferece extraordinária estabilidade devido à ausência de um hidrogênio secundário na posição β e à presença de um átomo central de carbono quaternário¹⁹. Os poliálcoois mais utilizados são trimetilolpropano (TMP), neopentilglicol e pentaeritritol. Os ácidos utilizados na síntese de poliolésteres podem ser de cadeia longa ou curta, saturada ou insaturada e linear ou ramificada. As seguintes características dos reagentes de partida afetam as propriedades do éster resultante: massa molar, o tamanho dos grupos acila, a funcionalidade dos polióis e o método de preparação do éster ou da mistura de ésteres.

Segundo Rudnick¹⁵, os ácidos graxos são essencialmente ácidos alifáticos de cadeia longa, não ramificada, com os átomos de carbono ligados a

hidrogênio e outros grupos, com a cadeia terminando com um ácido carboxílico. Os ácidos graxos mais comuns na natureza têm um número par de átomos de carbono em sua cadeia linear, variando de 14 a 22, sendo os de 16 ou 18 os mais abundantes. O grupo polar COOH é suficiente para fazer com que os ácidos graxos de cadeia curta sejam miscíveis em água. À medida que a cadeia aumenta, o ácido graxo se torna progressivamente menos miscível em água, assumindo características mais anfífilas. Em pontos onde átomos de carbono adjacentes perdem átomos de hidrogênio, estes apresentam uma dupla ligação em vez de uma ligação simples. Se essas ligações duplas ocorrem em múltiplos carbonos (até um máximo de seis), o ácido graxo é poli-insaturado. Ácidos graxos insaturados têm menores pontos de fusão do que saturados, e são mais abundantes nos organismos vivos.

Há uma relação entre o grau de linearidade da estrutura do ácido graxo e as propriedades e desempenho desta estrutura. É uma consequência direta da estrutura curva exibida por um ácido graxo que contém insaturação *cis* (como no caso dos óleos vegetais), o que contribui para a natureza líquida do óleo. Um óleo vegetal que contém apenas ácidos graxos saturados lineares ou uma alta porcentagem destes é, em geral, sólido à temperatura ambiente (Figura 13.6). Uma consequência disso é que esses materiais não apresentam benefícios como lubrificantes que necessitem ser utilizados em aplicações que apresentem uma ampla variação de temperatura. Por exemplo, se os ácidos graxos predominantes em um determinado óleo vegetal são saturados, o desempenho em baixas temperaturas será pior em relação ao de óleos vegetais que contenham predominantemente ácidos graxos mono ou poli-insaturados.

O óleo de soja ocupa a primeira colocação na produção mundial de óleos vegetais (29%) e representa uma importante fonte renovável. Nos Estados

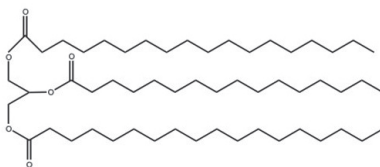


Figura 13.6 Estrutura de um óleo vegetal completamente saturado.

Unidos, a sua produção é de 2,5 bilhões de galões por ano, enquanto a produção mundial é de cerca de 6 bilhões de galões por ano. O óleo de soja

cru tem uma viscosidade próxima à de um óleo mineral (29 cSt – unidade de viscosidade *centistokes* – a 40 °C), um alto ponto de fulgor (325 °C) e um alto índice de viscosidade (246). Todos os óleos vegetais crus contêm alguns elementos naturais, tais como matéria não saponificada, goma e matéria graxa, os quais podem interferir na estabilidade, na solubilidade em hidrocarbonetos, nas reações químicas e no ponto de fluidez. Dessa forma, é necessária uma etapa de purificação para a obtenção de óleos vegetais refinados. Entretanto, para modificar a cadeia do ácido graxo do óleo vegetal, é necessário conhecer com exatidão sua composição, além de suas estabilidades térmica e oxidativa. A estrutura de triacilglicerol forma a espinha dorsal da maioria dos óleos vegetais, estando associada com as diferentes cadeias de ácidos graxos. A presença de insaturações na molécula de triacilglicerol (ácido oleico, linoleico e linolênico), funciona como sítios ativos para várias reações de oxidação. Ácidos graxos saturados têm uma estabilidade oxidativa relativamente mais alta¹⁵.

Mais de 90% das modificações químicas ocorrem nos grupos carboxílicos dos ácidos graxos, enquanto menos de 10% envolvem reações na cadeia do ácido graxo. Sem sacrificar as características favoráveis de viscosidade-temperatura e de lubricidade, óleos vegetais insaturados podem ser convertidos em produtos estáveis termo-oxidativamente, por meio da saturação das duplas ligações carbono-carbono utilizando reações de arilação, alquilação, ciclização, hidrogenação, epoxidação, entre outras. Por outro lado, as modificações químicas no grupo carboxila dos óleos vegetais incluem reações de interesterificação, transesterificação e hidrólise²⁰.

A transesterificação é o processo que utiliza um álcool (como metanol ou etanol) na presença de um catalisador (como hidróxido de sódio ou de potássio) para quebrar quimicamente a molécula do óleo vegetal em seus ésteres metílico ou etílico, com glicerina como subproduto. O óleo vegetal transesterificado é chamado de biodiesel, devido ao seu uso como combustível para motores a diesel. Um grande número de reações de transesterificação tem sido reportado com álcoois como metanol, etanol e isopropanol, para a obtenção de ésteres de usos comerciais como biodiesel, cosméticos e lubrificantes²¹.

As poucas reações de transesterificação reportadas utilizando álcoois superiores com 8 a 14 carbonos se dão para a produção de lubrificantes. A glicerina não é desejada na estrutura do triacilglicerol, devido à presença do átomo de hidrogênio no carbono localizado na posição β em relação à ligação éster. Isso torna o éster mais suscetível à reação de eliminação, levando à subsequente degradação da molécula. A baixa estabilidade do carbono β

do glicerol pode ser eliminada por meio da reação de transesterificação utilizando álcoois poli-hídricos mais resistentes, com uma estrutura neopentil sem hidrogênio no carbono β , como, por exemplo, isosorbitol ou neopentilpoliois, incluindo pentaeritritol (PE), neopentilglicol (NPG) ou trimetilolpropano (TMP) (Figura 13.7). Alcóxidos de sódio do álcool correspondente atuam como os melhores catalisadores para transesterificação, com rendimentos em termos de monoésteres variando de 80% a 90%. Outros catalisadores que também podem ser utilizados são óxido de cálcio e óxido de chumbo²².

A maior parte dos ésteres de álcoois superiores é obtida por um processo em duas etapas. Na primeira etapa, o óleo vegetal é hidrolisado ao seu ácido

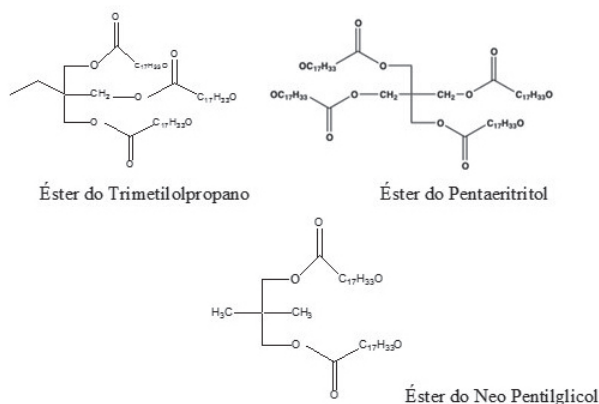


Figura 13.7 Estruturas moleculares de ésteres de poliál derivado do ácido ricinoleico.

graxo correspondente por uma variedade de métodos. Os ácidos graxos são, então, esterificados, em uma segunda etapa, com o álcool correspondente, utilizando alcóxido de sódio formado *in situ* e ácido p-toluenosulfônico e resinas trocadoras de cátions como catalisadores²³.

13.3.4 Obtenção de biolubrificantes via catálise enzimática

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos

industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos, catalisadas por lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: (1) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; (2) o fato de não requerer a presença de cofatores; (3) possuir uma larga especificidade pelo substrato; e (4) exibir uma alta enantiosseletividade²⁴.

O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial.

Embora, atualmente, as aplicações industriais das lipases estejam mais concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel, indústria de alimentos e no tratamento de efluentes ricos em óleos e graxas. As lipases vêm, desse modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais^{25,26}.

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilglicerois seus melhores substratos²⁷. São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas; porém, os micro-organismos são a fonte preferida, uma vez que são produzidas com altos rendimentos e produtividades, possuem grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva. Lipases de diferentes origens se encontram disponíveis atualmente no mercado e, desde 1979, já ocorre o emprego em larga escala de lipases como catalisadores de processos. Inicialmente, elas eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com o de outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os avanços registrados na área da biologia molecular têm permitido aos fabricantes de enzimas colocarem no mercado lipases microbianas com atividade bem elevada, a um custo bem mais acessível²⁸. As lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras²⁴.

Na indústria de lubrificantes, as lipases vêm sendo gradativamente inseridas, sobretudo atuando nas suas reações de síntese, tais como esterificação e transesterificação. Alguns fatores podem influenciar a conversão em uma

transesterificação enzimática, como o substrato utilizado (óleo vegetal ou álcool), a razão molar entre os substratos, o teor de água no meio reacional, a utilização ou não de solventes, a temperatura, se a enzima é em pó ou imobilizada, a concentração de lipase, entre outros. Apesar de alguns trabalhos na literatura descreverem a síntese de biolubrificantes utilizando diferentes lipases, é difícil fazer qualquer generalização a respeito das condições ótimas de reação, uma vez que lipases de fontes diferentes tendem a responder de forma distinta a mudanças no meio reacional²⁹.

Linko et al.³⁰ estudaram o uso de lipases na síntese de ésteres de trimetilolpropano com óleo de canola. A transesterificação para a síntese de tri-ésteres de trimetilolpropano a partir de ácidos graxos do óleo de canola foi conduzida tanto à pressão atmosférica em tubos fechados ou abertos de 13 mL quanto à pressão reduzida (2,0 KPa a 13,3 KPa). Após a reação, a amostra foi extraída com acetona, e a enzima precipitada foi removida por centrifugação, obtendo-se conversões superiores a 95% em 24 horas. Os experimentos foram acompanhados por cromatografia em camada fina (*thin layer chromatography* – TLC) e cromatografia líquida (*high pressure liquid chromatography* – HPLC).

A importância do controle do teor de água (atividade de água) na síntese de ésteres catalisada por lipases tem sido bastante enfatizada^{7,31}. A água é essencial para as reações enzimáticas. Normalmente, uma quantidade mínima de água é necessária para a catálise enzimática ocorrer, sendo a síntese de ésteres favorecida sob disponibilidade restrita de água (baixa atividade de água). A síntese de ésteres e a hidrólise são processos reversíveis, e o equilíbrio entre eles pode ser deslocado em direção à síntese tanto por excesso de um dos substratos quanto pelo controle do teor de água do sistema. A água é essencial para a lipase, a qual se torna inativa devido a mudanças estruturais na sua ausência. Assume-se que em um ambiente com atividade de água muito baixa, o espaço conformacional da enzima é restrito. Em ambientes completamente anidros, não há espaço para as mudanças conformacionais necessárias à ligação ao substrato. Lämås⁷ utilizou 3% de água obtendo uma conversão de 90% na reação entre óleo de canola e 2-etil-1-hexanol, catalisada por *C. rugosa*.

Na reação de transesterificação do trimetilolpropano (TMP) e éster metílico do óleo de canola (RMe), Lämås⁷ utilizou inicialmente a lipase imobilizada comercial *R. miehei* Lipozyme IM 20, obtendo conversão de ésteres de TMP da ordem de 90% sem a adição de água. Em seguida, utilizou a lipase em pó de *C. rugosa* sem nenhum solvente orgânico adicional. A ausência de solvente permite maiores concentrações de substrato e produto, simplifica

os processos pós-reação e aumenta a segurança operacional. Com uma temperatura de 47 °C e 15% de água adicionada, foi obtida uma conversão em tri-éster de TMP de 75% em 24 horas e de 98% em 68 horas. Nessas condições não ocorreu a formação de subprodutos nem foi observada a presença de RMe residual.

Uosukainen et al.³² também estudaram a transesterificação química e enzimática do TMP com éster metílico do óleo de canola (RMe). Na catálise química foi utilizado o metilato de sódio (0,7% em peso), e a reação ocorreu a uma temperatura de 120 °C por dez horas, com uma conversão de 98% em tri-ésteres de TMP. Já na catálise enzimática, foi utilizada a lipase de *Candida rugosa* em pó, para a qual foram testados vários suportes de imobilização. As condições reacionais foram mais brandas, sob vácuo e com temperatura de 47 °C. Após 68 horas, obteve-se uma conversão em tri-ésteres de TMP de 95%.

Em função de estudos anteriores que apontavam claramente que a conversão de RMe em ésteres de TMP poderia aumentar com o uso de uma lipase imobilizada, foram investigados vários materiais suportes para a imobilização da *C. rugosa*. As conversões mais altas em ésteres de TMP, da ordem de 95%, foram obtidas com a lipase imobilizada em Celite R-630. Com outros suportes (Duolites ES-561 e ES-762, GDC 200, GCC e HPA 25) foram obtidas conversões de aproximadamente 70%. Os autores também testaram a lipase comercial imobilizada *Rhizomucor miehei* Lipozyme IM 20, obtendo conversões de 90%.

Lämsä⁷ realizou a síntese química do éster 2-etil-hexil do óleo de canola, utilizando catalisadores alcalinos e ácidos. O progresso da reação foi acompanhado por TLC e HPLC e o produto obtido foi neutralizado com água ácida ou alcalina, dependendo do catalisador utilizado, e lavado três vezes com água a 50 °C. Essa mesma síntese também foi realizada com catalisador enzimático por 72 horas, com a lipase (*Candida rugosa*) sendo separada por centrifugação. Utilizando-se 3,3% de lipase obteve-se uma conversão de 80% em três horas e com 14,6% de lipase a conversão foi de 100% em uma hora. Além da *Candida rugosa*, foram testadas as lipases *M. miehei*, *Pseudomonas fluorescens* e *Chromobacterium viscosum*, todas imobilizadas em Amberlyte XAD-7.

Lämsä⁷ procedeu também à síntese química do éster de trimetilolpropano com óleo de canola da seguinte forma: o éster metílico do óleo de canola foi reagido com TMP a 120 °C por oito horas, utilizando metilato de sódio como catalisador. Após esfriar, o produto foi neutralizado com água ácida, lavado com água quente (50 °C) e seco com sulfato de sódio anidro. O

acompanhamento foi feito com TLC e HPLC. Essa mesma síntese também foi realizada com lipase, sendo que nesse caso, além do éster metílico e do TMP, houve adição de água (10% m/m) e de lipase (40% m/m), com uma temperatura de reação de 42 °C. Todas as reações ocorreram sob pressão reduzida. A melhor conversão (80%) foi obtida após 24 horas de reação. Durante as sínteses foi feito um planejamento experimental, com base na conversão obtida, para escolha do melhor catalisador, quantidade de catalisador, razão molar éster metílico/TMP, temperatura, tempo de reação e pressão. No caso da catálise enzimática, além da escolha da lipase (*Candida rugosa* apresentou os melhores resultados), estudou-se também a quantidade de água a ser adicionada (Tabela 13.2).

Tabela 13.2 Resultados de conversão obtidos por Lâmsa7 em função das variáveis estudadas

| PROCESSO QUÍMICO | | |
|-----------------------|-----------------------|---------------|
| VARIÁVEL | VALOR/TIPO ÓTIMO | CONVERSÃO (%) |
| Catalisador químico | Metóxido de sódio | 85,2 |
| Teor de catalisador | 0,7% (m/m) | 85,2 |
| Razão molar éster/TMP | 3,2:1,0 | 86,0 |
| Temperatura | 80 °C a 110 °C | 90,5 |
| Tempo de reação | 4 h | 90,5 |
| Vácuo | 3,3 MPa | 90,5 |
| PROCESSO ENZIMÁTICO | | |
| VARIÁVEL | VALOR/TIPO ÓTIMO | CONVERSÃO (%) |
| Lipase | <i>Candida rugosa</i> | 80,0 |
| Teor de catalisador | 40,0% | 80,0 |
| Razão molar éster/TMP | 3,5:1,0 | 95,0 |
| Temperatura | 42 °C | 97,5 |
| Tempo de reação | 24 h | 97,5 |
| Vácuo | 2,0 MPa | 70,0 |
| Teor de água | 15,0% | 90,0 |

Em síntese, a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura evidencia a viabilidade do uso de lipases como biocatalisadores na síntese de ésteres a partir de óleos vegetais, tanto para uso como biodiesel como para lubrificantes. Trabalhos da Petrobras em cooperação com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) trouxeram como inovação a utilização da lipase de *Candida rugosa* em reações de síntese de biolubrificantes derivados do óleo de mamona²⁶. O biolubrificante foi produzido com elevados rendimentos e apresentou excelentes propriedades, resultando em um pedido de depósito de patente (BR 102012 009727-3)³³. Nesse trabalho, investigou-se a obtenção, por catálise enzimática, de lubrificantes básicos sintéticos, utilizando-se como matéria-prima os biodieseis metílicos de mamona (ricinoleato de metila), de soja e de pinhão-manso. Foram estudadas as influências das variáveis de processo (tipo e teor de enzima, teor de água, temperatura, concentração de biodiesel, tempo de reação) em reatores de vidro (50 mL), sob vácuo e temperatura controlada. Os produtos e a conversão do substrato das reações de transesterificação foram determinados por cromatografia líquida (HPLC). Verificou-se que a variável temperatura era a que mais influenciava a conversão da reação estudada. Nas melhores condições reacionais as conversões foram superiores a 95%, em 24 horas, utilizando-se como biocatalisador a lipase de *Candida rugosa*. Os produtos obtidos apresentaram as seguintes propriedades lubrificantes e físico-químicas: viscosidade a 40 °C: 291,6 cSt; viscosidade a 100 °C: 27,59 cSt; índice de viscosidade: 126; e RPVOT (estabilidade oxidativa): 40 minutos, as quais indicam a viabilidade dessa rota na produção de lubrificantes sintéticos biodegradáveis. Entre as matérias-primas estudadas (biodieseis de mamona, de soja e de pinhão-manso), a mais promissora foi o biodiesel metílico de mamona, em função das conversões e das propriedades físico-químicas obtidas. Face ao grande investimento realizado nas regiões mais pobres do Brasil, com o objetivo de se incentivar o cultivo da mamona para que esta fosse a fonte principal do biodiesel a ser produzido no país, os resultados obtidos se tornaram muito importantes do ponto de vista socioeconômico, uma vez que a aplicação do biodiesel de mamona para a síntese de biolubrificantes é bastante nobre e representa um produto de alto valor agregado²⁶.

13.3.5 Técnica passo a passo

Com base na literatura e em função de características estruturais e propriedades físico-químicas, os reagentes utilizados foram os biodieseis de soja

e de pinhão-manso, além do ricinoleato de metila (biodiesel de mamona) com 88% de pureza, cedidos pela Petrobras, e o álcool trimetilolpropano (TMP) (Sigma-Aldrich) com 98% de pureza.

Também com base na literatura e nas características estruturais, utilizaram-se, como catalisadores enzimáticos, as seguintes lipases: *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM, Novozymes), *Candida antarctica* (Novozym 435, Novozymes) e *Candida rugosa* (Lipomod 34P, Biocatalysts). Todas essas enzimas são comerciais, sendo a Novozym imobilizada na resina aniônica macroporosa Duolite A568 e a Lipozyme imobilizada em resina de troca aniônica.

As reações foram realizadas em reatores de vidro (50 mL), termostatizados, com agitação magnética (700 rpm). Quando necessário, para se obter uma conversão maior, todo o sistema foi colocado sob pressão reduzida de 0,01 bar, proporcionada pela bomba de diafragma MZ 2C da Vacuubrand. Algumas reações foram realizadas à pressão atmosférica. O metanol formado foi recolhido com o auxílio de um “trap”.

O TMP e a água foram inicialmente adicionados aos reatores. Uma vez o TMP solubilizado, adicionou-se o ricinoleato de metila. Aguardou-se, então, que a temperatura do sistema atingisse o valor desejado, da reação, para então se adicionar a lipase. A partir desse momento, a agitação foi iniciada, e a bomba de vácuo ligada (quando necessário). A reação foi acompanhada durante cerca de 120 horas, com amostragens a cada 24 horas. No final da reação, a mistura foi filtrada em papel de filtro, centrifugada (5.000 rpm, 20 minutos) e armazenada em *freezer* com temperatura inferior a 0 °C até a sua utilização.

A conversão do reagente (ricinoleato de metila) em produtos foi calculada com base no desaparecimento do mesmo, acompanhado através de cromatografia líquida (HPLC).

Em relação à metodologia analítica empregada na caracterização dos biolubrificantes, as principais análises foram:

13.3.5.1 Viscosidade cinemática – ASTM D 445³⁴

Para a realização do ensaio de viscosidade, colocou-se um volume fixo de amostra em um tubo viscosimétrico calibrado (Cannon Fenske), e este em um banho com temperatura especificada e rigorosamente controlada ($\pm 0,01^\circ\text{C}$), conforme ilustrado na Figura 13.8. Em seguida, determinou-se o tempo para que o volume da amostra escoasse sob gravidade através do

capilar do viscosímetro. A viscosidade cinemática foi obtida pelo produto do tempo de escoamento medido pela constante de calibração do viscosímetro.



Figura 13.8 Equipamentos para medição da viscosidade cinemática.

13.3.5.2 Índice de viscosidade – ASTM D 2270³⁵

O índice de viscosidade (IV) é um número adimensional utilizado para caracterizar a variação da viscosidade cinemática de um produto derivado do petróleo com a temperatura. Um elevado índice de viscosidade significa uma pequena diminuição da viscosidade de um produto com o aumento da temperatura. Normalmente, o valor do índice de viscosidade é determinado através de cálculos que levam em consideração as viscosidades do produto a 40 °C e a 100 °C. Esses cálculos estão descritos na norma ASTM D 2270. Em resumo, existem dois procedimentos: A, para valores de IV até e inclusive 100, e B, para valores maiores que 100. Ambos os procedimentos se baseiam na medição prévia das viscosidades a 40 °C e a 100 °C da amostra.

Pelo procedimento A, calcula-se o IV pela Equação 13.1:

$$\text{(Equação 13.1)} \quad IV = [(L-U)/(L-H)] \times 100$$

em que L e H são parâmetros que podem ser extraídos de uma tabela, dependendo do valor da viscosidade a 100 °C da amostra, ou podem ser calculados (cSt); e U é a viscosidade cinemática a 40 °C da amostra (cSt).

Pelo procedimento B, calcula-se o IV pelas equações 13.2 e 13.3:

$$\text{(Equação 13.2)} \quad IV = [((\text{antilog } N)-1)/0,00715] + 100$$

$$\text{(Equação 13.3)} \quad N = (\log H - \log U)/\log L$$

em que L e H são parâmetros que podem ser extraídos de uma tabela, dependendo do valor da viscosidade a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ da amostra, ou podem ser calculados (cSt); e U é a viscosidade cinemática a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ da amostra (cSt).

13.3.5.3 Ponto de fluidez – ASTM D 97³⁶

Este ensaio foi por muito tempo o único utilizado para avaliar o comportamento dos óleos lubrificantes quando submetidos a baixas temperaturas. Atualmente existem outros ensaios que reproduzem mais fielmente o comportamento do óleo lubrificante no interior do equipamento, como, por exemplo, em motores automotivos. Após aquecimento preliminar, a amostra foi resfriada a uma velocidade especificada e observada em intervalos de $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para avaliar as características do escoamento (Figura 13.9). A menor temperatura na qual se observa movimento no óleo foi reportada como o ponto de fluidez.



Figura 13.9 Equipamento para medição do ponto de fluidez.

13.3.5.4 Estabilidade oxidativa pela bomba rotatória (RPVOT) – ASTM D 2272³⁷

Neste ensaio, um recipiente de aço, contendo a amostra de óleo e um catalisador metálico padronizado (cobre), foi pressurizado com oxigênio (90 psi). Em seguida, o recipiente foi mantido em um banho de silicone a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. O tempo necessário para o consumo de oxigênio equivalente a uma redução na pressão de 25 psi é medido. Quanto maior esse tempo, mais resistente à oxidação é o óleo (Figura 13.10).

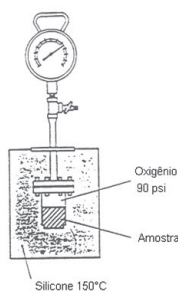


Figura 13.10 Esquema do equipamento bomba rotatória.

13.3.6 Aplicações e usos dos biolubrificantes

A principal função dos lubrificantes é minimizar fricção, desgaste, corrosão e formação de depósitos em vários sistemas mecânicos durante a sua operação. Dessa forma, a qualidade do lubrificante depende de várias propriedades físico-químicas, tais como viscosidade, fluidez, lubricidade, estabilidade termo-oxidativa, estabilidade hidrolítica e solvência para aditivos. Os óleos básicos correspondem em média a mais de 80% da composição do lubrificante acabado, controlando, assim, as propriedades físicas do óleo. Os óleos vegetais excedem os óleos minerais em propriedades como lubricidade, volatilidade, índice de viscosidade, etc. Por outro lado, parâmetros como proteção antidesgaste, capacidade de carga, prevenção à corrosão, espuma e demulsificação são similares aos dos óleos minerais, podendo ser melhorados com o uso de aditivos. Outras características também podem ser consideradas críticas, como detergência, compatibilidade com outros óleos básicos, homogeneidade durante longo período de estocagem, estabilidade hidrolítica, acidez, volatilidade e compatibilidade com elastômeros. Sabe-se que a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais depende dos ácidos graxos que o compõem. Quanto maior a insaturação na cadeia, menor será a estabilidade. O comprimento da cadeia linear, a presença de ramificações nesta e a presença de insaturações também afetam diferentes propriedades. Quanto maior o grau de ramificação da molécula de um biolubrificante, melhor a fluidez à baixa temperatura, maior a estabilidade hidrolítica e menor o índice de viscosidade (IV). O oposto se verifica em relação à linearidade. No caso de duplas ligações, quanto maior o grau de saturação, melhor a estabilidade oxidativa e pior a fluidez¹⁹. Básicos sintéticos obtidos a partir de

álcoois superiores (trimetilolpropano, pentaeritritol e neopentilglicol) com óleos vegetais exceto o óleo de mamona podem ser facilmente encontrados no mercado, com excelente desempenho.

A chave para o uso de lubrificantes baseados em óleos vegetais é que eles não servem para todas as aplicações. Não há óleo vegetal produzido em quantidade suficiente no mundo anualmente. A produção total de óleo vegetal não é utilizada na produção de lubrificantes. Assim, torna-se útil considerar o uso de óleos vegetais em aplicações lubrificantes nas quais as propriedades e o desempenho sejam mais bem equilibrados. No caso de óleos vegetais, isso ocorre em aplicações em que as máximas temperaturas de operação sejam inferiores a 120 °C. Por outro lado, estão as propriedades a baixas temperaturas dos óleos vegetais, em comparação com lubrificantes sintéticos, óleos minerais e óleos minerais quimicamente modificados (*chemically modified mineral oils* – CMMOs). Muitos desses lubrificantes têm excelentes propriedades a baixas temperaturas e podem ser utilizados em condições árticas por extensos períodos de tempo. Já os óleos vegetais devem ser empregados em aplicações nas quais a temperatura ambiente permaneça acima de -40 °C¹⁵.

Os lubrificantes podem ser classificados em duas categorias principais: automotivos e industriais. Mais de 70% do volume total de lubrificantes são utilizados como óleo de motor automotivo, com o restante servindo às aplicações industriais. As vantagens em termos de propriedades dos óleos vegetais quimicamente modificados (*chemically modified vegetable oils* – CMVOs), como alto índice de viscosidade (IV), baixa perda por evaporação, bom desempenho à baixa temperatura e liberação de produtos inócuos durante a operação, torna-os forte candidatos ao uso como lubrificantes. Devido ao seu custo elevado, as melhores áreas de aplicação para lubrificantes de base vegetal são aquelas nas quais as suas vantagens ambientais possam ser exploradas ao máximo¹⁵.

A viscosidade à baixa temperatura é a característica técnica mais importante dos lubrificantes modernos para motores automotivos. A partida a frio resulta em desgaste para o motor, o qual pode ser superado pelo uso de produtos que propiciem uma lubrificação efetiva imediata. Para atender a essas especificações relacionadas à eficiência energética, óleos de baixa viscosidade e baixa perda por evaporação têm sido introduzidos no mercado. Óleos vegetais transesterificados são bons candidatos a serem utilizados como óleo de motor devido à sua superior estabilidade térmica em relação ao óleo vegetal correspondente, baixa viscosidade, baixa formação de depósitos (intervalo de troca maior, sistemas mais limpos) e melhores

propriedades em baixas temperaturas. Entretanto, os óleos vegetais apresentam algumas desvantagens para essa aplicação, como: aumento de viscosidade com o uso, pela oxidação, reduzindo os intervalos de troca; incompatibilidade com óleos minerais, devendo se purgar o motor antes da troca; e limitações em baixas temperaturas para algumas formulações. Os fabricantes de motores não estão inclinados a aceitar um óleo de motor com um curto intervalo de troca¹⁵.

Um fluido hidráulico deve ter as seguintes características: poder de transmissão com um mínimo de perdas, lubrificação de superfícies deslizantes e proteção contra corrosão. A tendência ao uso de biolubrificantes nesta área é crescente devido à sua biodegradabilidade, reciclabilidade, resistência ao fogo, estabilidade térmica, bom desempenho em termos de desgaste e desempenho em altas e baixas temperaturas. Os óleos vegetais apresentam muitas das propriedades necessárias a fluidos hidráulicos, exceto por seu pobre desempenho em baixas temperaturas e baixas estabilidades à oxidação e hidrolítica, os quais podem ser superados por meio de modificações químicas adequadas³⁸.

Uma quantidade significativa de calor é gerada no processo de usinagem de metais. Esse calor é usualmente removido em parte pelos lubrificantes, denominados de “*rolling fluids*”, ou fluidos de laminação. Esses fluidos não apenas reduzem o calor no metal sendo laminado, como também servem para reduzir o atrito entre os cilindros, que são empregados no processo de laminação, e o metal sendo usinado. Isso é importante não apenas para proteger o equipamento, mas também para diminuir a força de laminação, melhorando a lubricidade do fluido. Os óleos vegetais são excelentes lubrificantes e têm sido utilizados com sucesso na formulação de fluidos de laminação¹⁵.

A variedade de estruturas químicas utilizadas para melhorar as propriedades e desempenho de lubrificantes é imensa. O objetivo no desenvolvimento de óleos totalmente formulados com básicos biodegradáveis consiste em empregar aditivos que sejam compatíveis com os lubrificantes e que sejam não tóxicos e biodegradáveis. Frequentemente, o destino dos aditivos no meio ambiente é desconhecido e a sua escolha é quase sempre baseada em desempenhos anteriores com óleo mineral ou com formulações sintéticas³⁹.

Os óleos que apresentam baixa estabilidade oxidativa podem ser utilizados em aplicações tais como óleo supressor de poeira e em tratamento de madeira. No primeiro caso, o óleo deve permanecer líquido e estável até sua aplicação na área que necessita controle de poeira. Em seguida, sua

oxidação ou polimerização se torna uma vantagem, uma vez que forma uma fina película sobre a poeira⁴⁰.

O Departamento de Agricultura do governo norte-americano (United States Department of Agriculture – USDA) propôs a implementação de um conjunto de regulamentações o qual exigiria que as agências federais utilizassem preferencialmente bioprodutos, incluindo biolubrificantes. Esses esforços ajudarão os Estados Unidos a se tornarem menos dependentes da importação de óleos estrangeiros e, ao mesmo tempo, incentivará o uso de produtos compatíveis com o meio ambiente. Essa regulamentação ajudará também no crescimento do volume de biolubrificantes, tornando-os mais viáveis economicamente. Esse programa, se implementado como proposto, fará com que as agências federais aumentem significativamente o uso de bioprodutos. As agências deverão adquirir esses produtos, onde quer que estejam disponíveis, desde que o custo não seja significativamente maior que o de um produto similar não biodegradável. Esses produtos também deverão apresentar desempenho similar ao dos produtos convencionais. O USDA está planejando assegurar que cada bioproduto contenha uma quantidade mínima de componentes biodegradáveis para ser incluído em uma determinada categoria. Essa regulamentação proposta fará com que as agências governamentais comprem lubrificantes, o que inclui óleo de motor, fluido de corte e uma variedade de fluidos hidráulicos, fabricados com componentes biodegradáveis¹⁵.

13.4 CONCLUSÕES

As forças que impulsionam o crescimento, de cerca de 10% ao ano, do mercado de biolubrificantes³, são, principalmente, a crescente conscientização ambiental no tocante ao uso de produtos ambientalmente compatíveis e a presença de incentivos e regulamentações governamentais. Entretanto, quando comparado com o mercado de óleos minerais, o uso de biolubrificantes ainda é reduzido, e está concentrado em alguns países da Europa e nos Estados Unidos. Para modificar esse cenário, o maior desafio para as indústrias do setor está na redução dos custos de produção de tais produtos, tornando seus preços mais atrativos. O processo químico apresenta baixo custo, porém ainda apresenta baixas conversões. Por outro lado, o processo enzimático, com altas conversões, apresenta custos elevados. As mais recentes tecnologias no desenvolvimento e imobilização de lipases podem contribuir na redução desses custos, tornando esses processos mais competitivos.

Diversos trabalhos publicados e patentes comprovam a viabilidade técnica do processo enzimático para a síntese de biolubrificantes (ésteres), empregando lipases como biocatalisador. Em alguns casos o processo enzimático apresentou conversões maiores (~ 98%) quando comparado ao processo via catálise química (~ 60%), para as mesmas reações estudadas^{26,41}.

Outra questão importante relacionada à utilização dos biolubrificantes se refere às suas características físico-químicas. Os biolubrificantes apresentam propriedades superiores, tais como viscosidade, índice de viscosidade e ponto de fluidez, comparativamente aos lubrificantes de base mineral. Entretanto, no item estabilidade oxidativa, esforços vêm sendo realizados para o desenvolvimento de produtos que apresentem resultados no mínimo semelhantes aos dos óleos minerais. Isso pode ser alcançado por meio de modificações químicas nas moléculas do biolubrificantes, ou pela adição de aditivos específicos às suas formulações. O problema está na necessidade de esses aditivos também serem biodegradáveis, para que não ocorra prejuízo à biodegradabilidade dos produtos como um todo. As indústrias de lubrificantes e de aditivos têm trabalhado em conjunto no sentido de desenvolverem produtos ambientalmente compatíveis.

A utilização de matérias-primas alternativas típicas de cada país, como o óleo de mamona no Brasil, é outro ponto de elevado interesse industrial tanto por razões econômicas quanto sociais. No caso do Brasil, os pequenos produtores da regiões mais pobres são incentivados a plantar mamona, a qual é facilmente cultivável nas condições climáticas brasileiras. Tais produtores, então, se tornam aptos a vender essas sementes de mamona para os produtores de óleo e de biodiesel, os quais podem também produzir biolubrificantes. Esse é um meio de promover a inclusão social em países em desenvolvimento. Outra característica interessante dessa oleaginosa é que, não sendo comestível, seu uso na indústria de biolubrificantes e biocombustíveis não compete com seu uso alimentar.

Finalmente, os biolubrificantes desempenharão um papel muito importante nas indústrias do futuro, em função do seu potencial social, econômico e ambiental.

13.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Entre os possíveis cenários futuros para a plena implementação da tecnologia de produção de biolubrificantes, destacam-se:

- 1) O maior nível de conscientização por parte dos mercados consumidores em relação aos benefícios do uso de biolubrificantes, e o consequente aumento desses mercados em função dessa maior preocupação e de incentivos e regulamentações governamentais, como, por exemplo, a recente regulamentação do governo dos Estados Unidos, por meio da sua Agência de Meio Ambiente (Environmental Protection Agency – EPA), de exigir a obrigatoriedade do uso de biolubrificantes em todas as embarcações que naveguem pelos Estados Unidos a partir de dezembro de 2013.
- 2) A produção de biolubrificantes com parâmetros de qualidade iguais ou superiores aos dos lubrificantes de base mineral.
- 3) A obtenção de biolubrificantes a partir de matérias-primas renováveis típicas de cada região, preferencialmente não comestíveis, procurando-se minimizar os custos de produção por meio de novas rotas sintéticas, equipamentos e catalisadores.
- 4) O desenvolvimento de aditivos biodegradáveis para minimizar as principais desvantagens em termos de propriedades dos biolubrificantes.

REFERÊNCIAS

1. Lindemann L, Gosalia A. The impact of the global raw material landscape on the worldwide lubricants market or vice-versa?. In: Proceedings of the 18th TAE International Colloquium Tribology. Ostfildern, Alemanha. 2012;1:2.
2. Whitby RD. Understanding the global lubricants business – Regional markets, economic issues and profitability. Apostila de Curso. Oxford; 2005.
3. Erhan SZ, Sharma BK, Liu Z, Adhvaryu A. Lubricant base stock potential of chemically modified vegetable oils. J. Agric. Food Chem. 2008;56:8919-25.
4. Bondioli P. From oil seeds to industrial products: present and future oleochemistry. Journal of Synthetic Lubrication. 2005;21:4:331-43.
5. Kolwzan B, Gryglewicz S. Synthesis and biodegradability of some adipic and sebacic esters. Journal of Synthetic Lubrication. 2003;20:2:100-7.
6. Bondioli P, Della Bella L, Manglaviti A. Synthesis of biolubricants with high viscosity and high oxidation stability. OCL. 2003;10:150-4.
7. Lämsä M. Environmentally friendly products based on vegetable oils [Tese de D.Sc.] Helsinki: Helsinki University of Technology; 1995.
8. Honary LAT. Biolubricants: a global overview. AOCS Inform. 2009;20:4:256-9.
9. Lastres LFM. Lubrificantes e Lubrificação em Motores de Combustão Interna. Petrobras/CENPES; 2003.
10. Caines A, Haycock R. Automotive Lubricants Reference Book. 1. ed. Warrendale: SAE; 1996. Cap. 1 e 2.
11. Do Brasil NI, Araújo MAS, De Sousa ECM. Processamento de Petróleo e Gás. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC; 2011. Cap. 17.
12. Murphy WR, Blain DA, Galiano-Roth AS. Benefits of synthetic lubricants in industrial applications. J Synthetic Lubrication. 2002;18(4):301-25.
13. Lubrizol. Ready Reference for Lubricant and Fuel Performance; 2002. p. 48.
14. Makkonen I. Environmentally compatible oils. Pointe-Claire: FERI; 1994.
15. Rudnick LR. Synthetics, mineral oils, and bio-based lubricants – chemistry and technology. Boca Raton: CRC Press; 2006. Cap. 21, 22, 24.
16. Goyan RL, Melley RE, Wissner PA, Ong WC. Biodegradable lubricants. Lubr Eng. 1998;54:10-7.
17. Gunderson RC, Hart AW. Synthetic lubricants. New York: Reinhold; 1962. p.103-150.
18. Rudnick LR, Shubkin RL. Synthetic lubricants and high-performance functional fluids. New York: Marcel Dekker; 1999. Cap. 1, 3–5.
19. Wagner H, Luther R, Mang T. Lubricant base fluids based on renewable raw materials. Their catalytic manufacture and modification. Applied Catalysis A: General. 2001;221:429-42.

20. Richtler HJ, Knaut J. Challenges to a mature industry: marketing and economics of oleochemicals in western Europe. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1984;61:2:160-75.
21. Anand ON, Mehta J, Prasada TSRR. Lubricants components from vegetable oils of indian origin. *J Synth Lubr*. 1998;15:97-106.
22. Zimmermann H, Schaaf E. On the chemistry of metal-ion catalyzed transesterification reactions. *J Prakt Chem*. 1970;312:660-8.
23. Dwidevi MC, Sapre S. Total vegetable-oil based greases prepared from castor oil. *J Synth Lubr*. 2002;19:3:229-41.
24. Castro HF, Mendes AA, Santos JC, et al. Modification of oils and fats by biotransformation. *Química Nova*. 2004;27(1):146-56.
25. Freire DMG, Castilho LR. Lipases em biocatálise. In: Silva EP, Ferrara MA, Corvo ML, editors. *Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*. 1. ed. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro; 2008. p. 367-83.
26. Silva JAC. Obtenção de um Lubrificante Biodegradável a partir de *Ésteres do Biodiesel da Mamona via Catálise Enzimática e Estudos de Estabilidade Oxidativa e Térmica* [Tese de D.Sc.]. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ; 2012.
27. Jaeger K-E, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH*. 1998;16(9):396-403.
28. Vulfson EN. Lipases: their structure, biochemistry and application. *Biochemical Education*. 1994 Oct;22(4):216.
29. Freire DMG, Sousa JS, Oliveira EAC. Biotechnological methods to produce biodiesel. In: Pandey A, Larroche C, Ricke SC, Dussap CG, Gnansounou E, editors. *Biofuels*. Burlington: Academic Press; 2011. p. 315-337.
30. Linko YY, Lämsä M, Xiaoyan W, Uosukainen E, Seppälä J, Linko P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. *Journal of Biotechnology*. 1998;66:41-50.
31. Wu XY, Jäskeläinen S, Linko YY. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification and transesterification. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996;19:226-231.
32. Uosukainen E, Linko YY, Lämsä M, Tervakangas T, Linko P. Transesterification of trimethylolpropane and rapeseed oil methyl ester to environmentally acceptable lubricants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 1998;75:11:1557-63.
33. Silva JAC, Freire DMG, Habert AC, Soares VF, inventores. Processo para a produção de biolubrificante a partir de biodiesel metílico e biolubrificante obtido pelo referido processo. PATENTE BR 102012 009727-3, 2012.
34. ASTM International. Norma D 445. Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and the Calculation of Dynamic Viscosity). West Conshohocken; 2009.

35. ASTM International. Norma D 2270. Standard Practice for Calculating Viscosity Index from Kinematic Viscosity at 40 and 100 °C. West Conshohocken; 2004.
36. ASTM International. Norma ASTM D 97. Standard Test Method for Pour Point of Petroleum Products. West Conshohocken; 2009.
37. ASTM International. Norma ASTM D 2272. Standard Test Method for Oxidation Stability of Steam Turbine Oils by Rotating Pressure Vessel. West Conshohocken; 2009.
38. Bartz WJ. Synthetic Hydraulic Fluids for High Performance Applications. STLE 55th Annual Meeting. Nashville; 2000.
39. Rudnick LR. Additives: Chemistry and Applications. New York: Marcel Dekker; 2003. p. 1-27.
40. Honary LAT, Richter E. Biobased Lubricants and Greases. 1. ed. New York: Wiley; 2011. p. 92-101.
41. Silva JAC. Desenvolvimento de um Lubrificante Biodegradável a partir de *Ésteres do Biodiesel da Mamona* [Dissertação de M.Sc.]. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ; 2006.

PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DA QUITOSANA NA AGRICULTURA E EM ALIMENTOS

Thatiana Montenegro Stamford Arnaud
Thayza Christina Montenegro Stamford
Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Newton Pereira Stamford

14.1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um heteropolímero natural, amino catiônico, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina, derivado da N-desacetilação da quitina, denominação usual para o polímero β -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina). A quitina e a celulose são semelhantes em sua natureza funcional (baixa solubilidade e baixa reatividade química), e tal analogia está refletida nas funções similares desses polímeros na natureza, já que ambos atuam como material estrutural (Figura 14.1). A quitina difere da celulose na sua estrutura polimérica pela substituição da hidroxila por um grupo acetamina no carbono de posição 2,

sendo, provavelmente, a mais abundante fibra de ocorrência natural depois da celulose¹⁷.

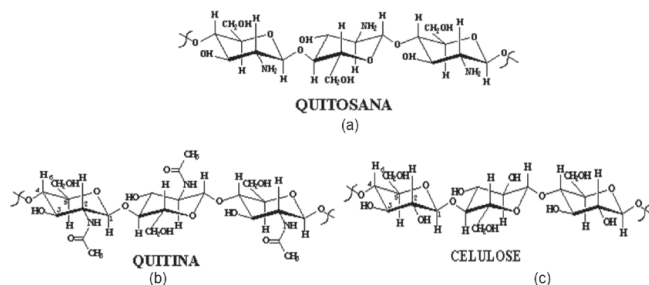


Figura 14.1 (a) Estrutura da quitosana; (b) quitina; e (c) celulose.²¹

A quitosana industrial é, na maioria das vezes, extraída do exoesqueleto de crustáceos, sendo obtida pela desacetilação da quitina por meio da utilização de NaOH 50% e temperatura em torno de 110 °C. A quitina e a quitosana podem ser extraídas da parede celular de algumas espécies de fungos, mais particularmente da classe *Zygomycetes* e, em geral, da ordem *Mucorales*, que apresentam maior quantidade de quitina e quitosana. A quitosana também pode ser produzida artificialmente, a partir da abertura do anel do grupo exazolina de um derivado glicosídico ou a partir da biossíntese da própria glicose, a qual é convertida inicialmente em aminoácidos, sendo, em seguida, acetilada e finalmente polimerizada por atuação enzimática^{2,18,37,22,31}.

A quitosana é, portanto, proveniente da N-desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando diversos derivados da quitosana. Nesse sentido, a quitosana não é uma entidade química uniforme, mas um grupo de polímeros parcialmente desacetilados. Quando os produtos obtidos apresentam grau de desacetilação acima de 60%, já podem ser considerados como quitosana, sendo que as aplicações e características do polímero dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia²².

Na área agrícola, sabe-se que a produtividade das plantas normalmente é garantida pela utilização de fertilizantes minerais solúveis, principalmente para fornecimento de nitrogênio, fósforo e potássio. Todavia, a aplicação desses fertilizantes solúveis, na maioria das vezes, pode promover substancial aumento nos custos de produção, além de riscos de contaminação

ambiental⁴⁴. Os fertilizantes potássicos encontram-se entre os mais utilizados na agricultura brasileira e são quase que inteiramente atendidos por importações, que chegam a mais de 6 milhões de toneladas por ano, uma vez que a produção nacional limita-se a apenas 650 mil toneladas ao ano⁴¹.

A utilização direta de rochas moídas na fertilização seria viável, porém seu emprego é restrito devido à sua baixa solubilidade, fazendo com que seja necessária a adição de grandes quantidades de rochas moídas⁴⁶. Uma alternativa viável para a substituição de fertilizantes solúveis é a produção de biofertilizantes naturais obtidos a partir de rochas moídas inoculadas com a bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus* (do gênero *Proteobacteria* e gram-negativa), que tem a habilidade de produzir ácido sulfúrico por via metabólica, possibilitando a solubilização de minerais contidos nas rochas moídas. O biofertilizante de rochas obtido dessa forma origina-se de um processo prático que reduz o consumo de energia com aumento da disponibilidade de nutrientes para as plantas, e que minimiza os impactos ambientais tendo em vista que a liberação é realizada de forma mais lenta, comparada com fertilizantes minerais solúveis. Assim, verifica-se a utilização normal pelas plantas, com redução da possibilidade de arraste para as camadas mais profundas do solo e mesmo para o lençol freático, com redução da ocorrência de problemas ambientais⁴⁴.

Atualmente, faz-se totalmente necessária a conservação dos alimentos, especialmente de frutos e seus subprodutos mantidos em prateleira, e nesse sentido tem sido observado sensível impacto sobre a disponibilidade de alimentos ao longo do tempo, quando em seu estado de produtos minimamente processados. A presença de fungos e, conseqüentemente, a atividade metabólica desses agentes, é reconhecida como uma das principais causas biológicas primárias de perdas de produtos perecíveis de origem vegetal, principalmente de frutas e de seus subprodutos.

O controle químico permanece sendo o principal mecanismo de controle da redução da incidência de doenças pós-colheita causadas por fungos em frutos e em seus derivados, conduzindo a uma considerável perda desses produtos antes da sua comercialização. O amplo uso de fungicidas sintéticos nesses alimentos apresenta significativas desvantagens, incluindo o aumento do custo da produção, perigos para os manipuladores, preocupação acerca de resíduos em alimentos, ameaça à saúde pública e ao meio ambiente.

Na indústria alimentícia, a quitosana também oferece um amplo espectro de possíveis aplicações, como a formação de filmes biodegradáveis, a recuperação de subprodutos, a purificação de água, a clarificação de sucos de frutas, a encapsulação de aromas, a atuação como agente antioxidante,

emulsificante e estabilizante, destacando-se sua eficácia quanto à preservação da qualidade microbiológica do alimento^{14,15,27}.

O presente capítulo tem por objetivos a caracterização, a produção e a utilização da quitosana de crustáceos e de fungos da ordem *Mucorales*, assim como a avaliação da efetividade do biopolímero na inibição de micro-organismos toxigênicos, a fim de mostrar seu potencial de utilização na agricultura, em alimentos e no ambiente.

14.2 HISTÓRICO

Agências internacionais de monitoramento dos recursos alimentares no mundo reconhecem que a opção mais viável para alcançar a futura necessidade de alimentos seria a redução de perdas pós-colheita. A literatura atual é vasta em materiais sobre quitina e quitosana, e várias revisões abordando diferentes aspectos desses polímeros e seus derivados, que encontram aplicação na área industrial, tecnológica, agrícola, ambiental, na conservação de alimentos e na medicina, podem ser encontradas. As características físico-químicas derivadas da formação de complexos polieletrólíticos, com propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, justificam a razão pela qual a obtenção e produção desses polissacarídeos têm sido extensivamente estudadas na atualidade^{25,52,11}.

Apesar de serem propostas alternativas às industriais para obtenção e produção de quitosana proveniente de crustáceos, recentes avanços na tecnologia das fermentações sugerem que o cultivo em larga escala de micro-organismos que contenham quitina e quitosana é um artifício promissor em relação à fonte tradicional de quitosana, por razões como: extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala, padronização do produto a partir do controle do processo fermentativo, além de ser uma técnica simples, de baixo custo e que não gera resíduos poluentes^{36,1}.

Assim, tem sido investigada a habilidade da produção desses biopolímeros por diversos gêneros e espécies de fungos, tais como *Cunninghamella elegans*^{22,23}, *C. bertholletige*¹, *Mucor circinelloides*, *M. racemosus*, *M. rouxii*, *M. javanicus*, *Aspergillus niger*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida albicans*³⁷, *Rhizopus oryzae*, *R. oligosporus*, *R. stolonifer* e *Absidia coerulea*³⁵, relatando-se rendimentos iguais ou superiores aos obtidos por meio da utilização de fontes tradicionais^{3,1}.

Nas últimas décadas, visando ao aproveitamento de novas tecnologias para obtenção de fertilizantes naturais biológicos, aqui denominados de biofertilizantes, intensificaram-se as pesquisas para utilização de minerais de rochas. A produção e uso de biofertilizantes fosfatados e potássicos produzidos a partir de rochas, com eficiência comprovada, tem sido relatada em diversos trabalhos^{44,45,30,34,39,46,47,4}.

A produção de fertilizantes de rochas moídas vem sendo realizada com o uso de enxofre elementar inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus*, produto aqui denominado de biofertilizante de rochas. O micro-organismo a partir da produção metabólica de ácido sulfúrico participa na disponibilização dos minerais contidos nas rochas, principalmente fosfatos naturais (apatitas), que possuem ampla quantidade de fósforo e cálcio (apatita), e as biotitas com potássio e magnésio. O enxofre elementar, ao ser oxidado pela bactéria *Acidithiobacillus*, produz ácido sulfúrico metabolicamente, sendo o próton H^+ responsável pela liberação de nutrientes contidos nos minerais. Observa-se também a produção de enxofre elementar na forma de SO_4^{2-} solúvel, que pode ser absorvido pelas plantas.

O nitrogênio é o nutriente que mais limita a produtividade, e normalmente ocorre no solo em níveis abaixo do necessário para o desenvolvimento adequado das culturas. Em função de suas inúmeras transformações e pela sua alta solubilidade, pode sofrer lixiviação para as camadas mais profundas do solo, e mesmo para o lençol freático, possibilitando a contaminação ambiental.

Resíduos orgânicos que não apresentam possibilidades de promover problemas ambientais são denominados de matéria orgânica de nova geração. Podem ser considerados materiais orgânicos de nova geração: restos culturais, torta de mamona, torta de cana-de-açúcar, húmus de minhoca, resíduos diversos provenientes da agroindústria como resíduos da produção de bebidas, entre outros, os quais podem ser utilizados para aporte de nitrogênio e produção de biofertilizante orgânico. A incorporação de resíduos orgânicos, além de melhorar as condições físicas do solo, contribui para o aumento da atividade biológica e o fornecimento de nutrientes para a planta. Entretanto, de uma maneira geral, os resíduos empregados na agricultura apresentam baixa concentração de nitrogênio⁴⁷.

As bactérias diazotróficas de vida livre são as que apresentam maior potencial de utilização como alternativa para o enriquecimento dos resíduos orgânicos em nitrogênio disponível. Tais bactérias abrangem micro-organismos que podem ser encontrados no solo e em ambientes aquáticos e que, necessariamente, não fazem parte de estruturas mutualísticas ou

associativas^{47,29}. As bactérias diazotróficas de vida livre podem enriquecer em nitrogênio materiais orgânicos com baixo teor do nutriente, com aumento superior a 100%. Sem dúvida esse processo promove amplas e importantes possibilidades de aplicação para a produção de biofertilizante orgânico em mistura com os biofertilizantes de rochas, o que torna possível a aplicação dos nutrientes mais importantes para as culturas em forma disponível.

Por outro lado, pesquisas demonstram a liberação de quitosana por fungos da ordem *Mucorales*, como, por exemplo, *Cunninghamella elegans*, *Mucor rouxii*, *Mucor circinelloides*, entre outros, e o biopolímero tem mostrado elevado potencial na liberação de polifosfato inorgânico^{22,23}, além de também poder atuar como bioprotetor contra doenças de plantas. Portanto, a adição de quitosana de fungos ainda poderá contribuir para a produção de um bioprotetor, com aumento considerável na disponibilização de nutrientes e também com potencial para promover resistência das plantas a fitopatógenos^{23,13}.

A quitosana presente na parede celular de fungos (*Mucorales*) tem demonstrado grandes vantagens, tais como extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade e produção em larga escala. A quantidade desses polissacarídeos extraída da biomassa varia segundo a espécie de fungo e as condições de cultivo. Geralmente, fungos da classe *Zygomycetes* apresentam maior quantidade de quitina e quitosana em sua parede celular^{22,1,45}.

14.3 APLICAÇÃO DE QUITOSANA NA AGRICULTURA

Inicialmente é realizada a produção do biofertilizante misto (BNPK) com nitrogênio, fósforo e potássio, a partir da mistura de biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas por meio da adição de enxofre elementar com a bactéria *Acidithiobacillus*, em mistura com materiais orgânicos inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre. Após a obtenção do BNPK, realiza-se a inoculação com fungo produtor de quitosana a fim de se produzir o bioprotetor^{44,13}.

As espécies de bactérias diazotróficas atualmente selecionadas incrementam em mais de 100% o teor de nitrogênio da matéria orgânica, sendo mais utilizado o húmus de minhoca. É importante observar que, para a produção do BNPK enriquecido em nitrogênio, deve ser adicionado um componente orgânico energético, tal como resíduo de sorvete, vinhaça, resíduos de frutas, entre outros, para fornecimento de carbono e energia. A adição do resíduo

visa incrementar o desenvolvimento das bactérias diazotróficas de vida livre, que irão incorporar nitrogênio atmosférico ao biofertilizante através do processo da fixação biológica do N_2 .

Em seguida, na fase de produção do bioprotetor, é promovida a atuação de fungos da ordem *Mucorales*, especialmente *Cunninghamella elegans* e/ou *Mucor circinelloides*, que apresentam quitina e quitosana na parede celular. O biopolímero quitosana comprovadamente atua na proteção das plantas contra doenças, e, como também produzem polifosfato inorgânico, aumenta a concentração de fósforo disponível no produto²³.

Assim, pode ser observada a possibilidade de seu emprego na produção de um protetor e biofertilizante com ação direta no produto, através da incorporação da quitosana fúngica que ocorre na parede celular de alguns fungos, o que é uma característica de singular aplicabilidade. Vale salientar que os produtos obtidos são passíveis de aproveitamento por pequenos, médios e grandes produtores, como também, de modo especial, por indústrias de fertilizantes (Figura 14.2).

Por outro lado, também merece atenção especial a aplicação da quitosana elaborada em laboratório, principalmente na forma de nanopartículas, visando à atuação contra fitopatógenos por aplicação via foliar.



Figura 14.2 Produção do biofertilizante de rochas e orgânico (húmus de minhoca) inoculado com bactéria diazotrófica de vida livre.

14.4 PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE E BIOPROTETOR

14.4.1 Produção de biofertilizante misto (BNPK)

A eficiência agronômica dos biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas, obtidos a partir de diferentes rochas, já foi comprovada em experimentação com várias culturas econômicas e em diferentes solos^{44,45,46,47}.

Bactérias de vida livre dotadas da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico podem ser isoladas de amostras de diferentes solos (profundidade de 0 a 20 cm), colocadas para secar, destorroadas e, em seguida, passadas em peneira (malha 50). Transferem-se 0,25 g de cada amostra de solo diretamente para placas de Petri contendo meio sílica-gel, incubadas à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$), por 15 dias, em câmara de crescimento tipo B.O.D., e realizam-se observações diárias.

As colônias crescidas devem ser transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura sólido LG^{29,12}. O meio LG contém por litro:

- 20 g de sacarose ou açúcar cristal;
- 0,05 g de K_2HPO_4 ;
- 0,15 g de KH_2PO_4 ;
- 0,02 g de CaCl_2 ;
- 0,20 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 0,002 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 0,01 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 5 mL de azul de bromotimol (solução 0,5 % em etanol); e
- 1 g de CaCO_3 .

Além disso, o pH é ajustado para 7,0 e ocorre a adição de 15 g de ágar (P.A.). Os novos isolados deverão ser purificados com adição de 10 mL de água destilada e esterilizada nas placas de Petri e, em seguida, realizada raspagem das colônias crescidas, utilizando câmara de fluxo laminar. As concentrações das suspensões bacterianas devem ser ajustadas para densidade ótica ($\text{DO}_{560\text{nm}}$) de 0,4 em espectrofotômetro e, em seguida, deve-se transferir alíquota de 1 mL para Erlenmeyers contendo 1 L de meio de cultura líquido LG. Após a purificação, os isolados deverão ser mantidos em tubos com meio LG e então conservados em óleo mineral. Posteriormente, deve-se realizar a manutenção definitiva por liofilização. É interessante realizar a caracterização morfológica e genotípica de novos isolados. Normalmente

as amostras resultantes da PCR devem ser enviadas para laboratórios especializados em sequenciamento, e, posteriormente, as sequências devem ser comparadas com as existentes em bancos de dados on-line e com amostras da Embrapa (Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia – CNPAB, no Rio de Janeiro).

14.4.2 Produção de bioprotetor com quitosana

Para a produção de bioprotetor, podem ser utilizados fungos da ordem *Mucorales*, como *Cunninghamella elegans*, *Mucor circinelloides* e *Mucor rouxii*, entre outros, cujas amostras devem ser estocadas em meio BDA sob refrigeração (5 °C). Esporângios produzidos pelos fungos devem ser coletados em água destilada, contados em hematocitômetro com padronização de inóculo em 10^7 (esporângios mL^{-1}), e as células devem ser crescidas em meio sintético para *Mucorales* (SMM), constituído de:

- 40 g L^{-1} de glicose;
- 2 g L^{-1} de asparagina;
- 0,005 g L^{-1} de tiamina;
- 0,5 g L^{-1} de fosfato de potássio; e
- 0,25 de g L^{-1} sulfato de magnésio²⁶.

Deve-se transferir cerca de 1 mL de inóculo para frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio. Os frascos devem ser incubados durante sete dias sob agitação orbital de 5.000 g. Ao final do crescimento, a massa micelial deverá ser coletada em membrana de *nylon* (120 F), lavada duas vezes com água destilada e, posteriormente, submetida a liofilização para determinação da matéria seca da biomassa²². A aplicação do fungo produtor de quitosana deve ser realizada de uma só vez, no início do ensaio. É **preciso coletar** amostras em vários períodos (exemplo: 5, 10, 15, 20 e 30 dias após a inoculação), para determinação de: quitina e quitosana, pH, condutividade elétrica (C.E.), carbono, nitrogênio e enxofre total, N-proteico, N-NO_3^- , N-NH_4^+ ; fósforo disponível; potássio disponível; magnésio e cálcio trocáveis e S-SO_4^{2-} solúvel. Também poderão ser analisadas algumas enzimas importantes, como nitrogenase, quitinase e catalase.

14.5 BIOPROTETOR COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

O termo nanopartículas é genérico, sendo os materiais nanoestruturados geralmente definidos como os que apresentam ao menos uma dimensão na faixa de tamanho nanométrico, abaixo do tamanho crítico do material capaz de alterar alguma de suas propriedades. Dessa forma, considera-se um nanomaterial aquele que possui pelo menos uma propriedade que se manifeste exclusivamente devido à escala nano. Esta propriedade deve ser diferente do material massivo ("bulk").

As nanopartículas podem ser preparadas a partir de uma variedade de materiais, tais como proteínas e polímeros. A seleção desse material depende de muitos fatores, incluindo (a) o tamanho das nanopartículas; (b) as propriedades intrínsecas; (c) as características da superfície, como a carga e a permeabilidade; (d) o grau de biodegradabilidade, biocompatibilidade e toxicidade, dentre outros. As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, como a quitosana, incluem as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural (Figura 14.3).

Denominam-se esferas os sistemas em que o material está homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Dessa forma, obtém-se um sistema monolítico em que não é possível identificar um

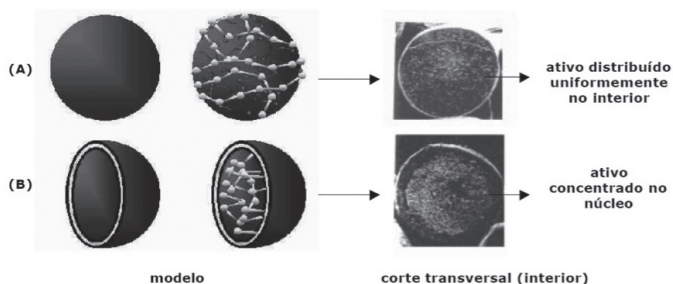


Figura 14.3 Diferentes nanopartículas com aplicação farmacêutica: (A) nanoesfera (sistema matricial) e (B) nanocápsula (sistema reservatório). Modificada de Azevedo (2007)⁷.

núcleo diferenciado. A nanocápsula constitui o sistema do tipo reservatório, em que é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Nesse caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana polimérica que isola o núcleo do meio externo.

Os métodos de obtenção de nanoesferas e nanocápsulas são semelhantes, porém há diferença nos mecanismos de polimerização, os quais são classificados da seguinte forma: (a) dispersão ou precipitação de polímeros pré-formados; (b) polimerização de monômeros dispersos *in situ*; (c) copolimerização interfacial, que forma nanocápsula pelo contato entre os monômeros na interface (Figura 14.4); e (d) coacervação dos polímeros hidrofílicos ou gelificação iônica.

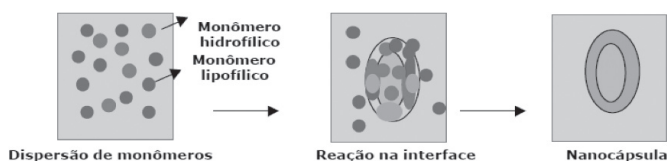


Figura 14.4 Método de copolimerização interfacial para preparar nanocápsulas. Modificada de Mohanraj e Chen (2006)³³.

A coacervação dos polímeros hidrofílicos ou gelificação iônica é o método que foi empregado pelo grupo de pesquisa. Na preparação de nanopartículas de quitosana, também existem na literatura outros métodos, como: (a) emulsão “*cross-linking*”; (b) coalescência de gotas de emulsão; (c) micela reversa; e (d) modificação química da quitosana^{24,28}.

14.5.1 Método de gelificação iônica

A gelificação iônica é um método físico-químico de preparação de nanopartículas que consiste, de modo geral, na dissolução de um fármaco juntamente com um polímero em determinado solvente, seguida da adição, sob agitação constante, de um não solvente à mistura. O não solvente pode causar a precipitação do polímero ou a separação de fases (muitas vezes chamadas de processo de coacervação). Esses processos de coacervação podem ser divididos em: (a) simples (por mudança no pH, força iônica, temperatura); ou (b) complexos (complexação entre dois polieletrólitos de carga oposta)^{7,8}. Nesse último caso, ocorre entre a estrutura da quitosana (polieletrólito positivo) e a estrutura do agente surfactante, como o tripolifosfato de pentasódio (TPP) (Figura 14.5).

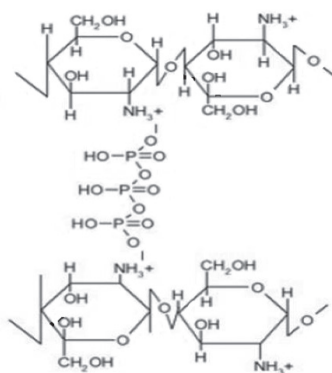


Figura 14.5 Interação iônica entre a quitosana e o tripolifosfato de pentasódio (TPP). Modificada de Azevedo et al. (2010)⁸.

O tripolifosfato de pentasódio (TPP) é usado para preparar nanopartículas de quitosana por ser um polieletrólito atóxico, capaz de formar géis com a interação de suas cargas negativas e as dos grupos amínicos da quitosana. Essa interação pode ser controlada pela densidade de carga da quitosana e do TPP, que depende, principalmente, do pH da solução¹¹. Na literatura, estão disponíveis trabalhos visando à preparação de nanopartículas biodegradáveis com polímeros hidrofílicos, como a quitosana, a gelatina e o alginato de sódio. Um método para preparar nanopartículas de quitosana por gelificação iônica foi desenvolvido por Calvo¹⁶, e é descrito a seguir. Nesse método, o grupo amínico da quitosana é carregado positivamente interagindo com o TPP de carga negativa para formar coacervados com um tamanho na faixa de nanômetros. Coacervados são formados como resultado de interação eletrostática entre duas fases aquosas, que, por gelificação iônica, envolvem o material em fase de transição do estado líquido para o gel^{24,51}.

14.5.2 Produção de nanopartícula de quitosana pelo método de gelificação iônica

Dissolver 0,5 g das quitosanas em 50 mL de ácido acético 2% e agitar por 30 minutos. Adicionar lentamente a cada grupo 20 mL de TPP 1%, mantidos sob agitação durante 2 horas. Centrifugar a 13.400 g por 10 minutos e acrescentar mais soluções ao mesmo microtubo (*ependorf*). Na última alíquota da solução, retirar o sobrenadante, acrescentar água destilada e

homogeneizar as amostras, com lavagens repetidas por 5 vezes, sempre intercalando com a centrifugação a 13.400 g por 5 minutos. Após a última lavagem, retirar os sobrenadantes e liofilizar os precipitados.

14.6 APLICAÇÃO DA QUITOSANA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Na indústria alimentícia, a quitosana oferece um amplo espectro de possíveis aplicações como agente antimicrobiano, estabilizante, antioxidante, emulsificante, na formulação de biofilmes, redução da respiração de frutos, barreira à perda de umidade, redução da produção de etileno e poligalacturonase em frutos, encapsulação de aromas e recuperação de subprodutos²⁷. A quitosana em concentrações muito baixas tem apresentado propriedade protetora de vegetais, podendo ativar mecanismos de defesa nestes contra o ataque de patógenos (Figura 14.6).

As perspectivas de aplicações são ainda aumentadas pela possibilidade de a quitosana ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes, microesferas e nanopartículas^{19,28,33,8}.

14.6.1 Mecanismos de ação da quitosana

Na indústria alimentícia, a quitosana oferece um amplo espectro de possíveis aplicações, como formação de revestimentos biodegradáveis, recuperação de subprodutos, purificação de água, clarificação de sucos, ação emulsificante de aromas e agente antioxidante e estabilizante, destacando-se a sua eficácia na preservação da qualidade microbiológica do alimento. Industrialmente, no Brasil, a desacetilação da quitosana ainda não está padronizada, acarretando a obtenção de quitosana heterogênea em relação ao grau de desacetilação e peso molar, o que dificulta a uniformização no processo de obtenção dos géis e revestimentos¹⁵.

A ação antimicrobiana da quitosana se dá em relação a uma grande variedade de micro-organismos, como bactérias, fungos e algas, sendo que o mecanismo dessa ação ainda não foi totalmente elucidado⁴⁹. Na literatura são encontrados vários mecanismos de ação, e alguns autores defendem a protonação dos grupos amínicos da quitosana quando em contato com fluidos fisiológicos, com ligação aos grupos aniônicos dos micro-organismos e posterior aglutinação das células microbianas e efeito inibitório no

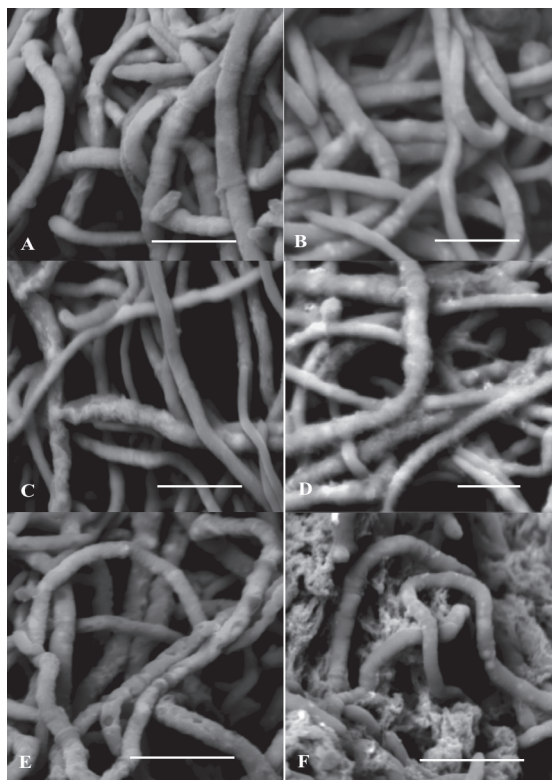


Figura 14.6 Microscopia eletrônica mostrando o efeito de diferentes doses de quitosana de alto e baixo peso molar nas hifas do fungo patogênico *Botrytis cinerea* causador da podridão cinzenta de frutos, em comparação com o tratamento sem adição de quitosana (A) em diferentes períodos de crescimento, em função do tempo (0 a 96 horas) de avaliação (B, C, D, E, F). Material cedido pelo prof. Marcos Antonio Lima (2014).

crescimento. Paralelamente, há relatos sobre a interação entre a carga positiva da quitosana e a carga negativa da parede celular do micro-organismo, ocasionando a ruptura da parede celular e a perda de importantes constituintes intracelulares, o que inviabiliza a vida microbiana^{6,48}.

Podem ocorrer diferentes mecanismos de ação, de acordo com o peso molar do polímero, uma vez que a quitosana de baixo peso molar é capaz de penetrar nas células e se ligar ao DNA microbiano, inibindo a transcrição e a tradução. Por outro lado, a quitosana de alto peso molar apresenta ação de quelação, com ligação de metais essenciais na produção de toxinas e crescimento do micro-organismo³⁸.

Essa ação é decorrente da habilidade da quitosana de produzir quelados com íons metálicos, os quais agem como catalisador na reação da oxidação lipídica. Por outro lado, devido à capacidade de quelação com íons metálicos, a quitosana pode agir controlando o escurecimento enzimático em produtos vegetais, por quelação com o íon cobre presente no centro ativo da polifenoloxidase, enzima responsável por esse processo^{9,21}.

14.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) da quitosana podem ser determinadas através da técnica de macrodiluição em caldo Sabouraud (10 g de peptona, 20 g de dextrose, 1 L de água destilada, pH 5,6).

Inicialmente deve ser realizada a padronização da suspensão dos esporos fúngicos (fungos filamentosos) em câmara Neubauer. Primeiramente, o fungo é crescido em placa de Petri contendo meio ágar Sabouraud a 28 °C, por 96 horas. Após o período de incubação, os esporos são coletados com *swab* e suspensos em solução salina 0,9%. A quantificação dos esporos por mililitro da solução salina é determinada por contagem direta em câmara de Neubauer. A câmara e a lamínula devem ser limpas previamente com etanol (70%). Na sequência, com o auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 100 µL da suspensão de esporos é transferida para a câmara. A seguir, a câmara é colocada sob o microscópio (objetiva de 40×) com o qual será realizada a contagem dos esporos. São contados todos os esporos que estão dentro da área do quadrado grande central, incluindo aqueles que estão sobre as linhas superiores e direitas do perímetro externo do quadrado médio (Figura 14.7). Os esporos sobre as linhas inferiores e esquerdas desse quadrado não são incluídos na contagem. Após a contagem, a lamínula é retirada e, juntamente com a câmara, devem ser limpas com etanol (70%), sendo esse protocolo realizado em duplicata e repetido para as outras suspensões.

Deve ser inoculada nos tubos de ensaio contendo meio de cultura e substância teste uma suspensão fúngica na concentração final de 10⁶ esporos/mL, passando por uma incubação a 28°C e realizada por 96 horas. No final do período de incubação, verifica-se qual tubo não apresentou crescimento fúngico visível, o qual deve ser considerado como a CIM. A seguir, alíquotas dos tubos com ausência de crescimento, assim como do tubo controle (contendo

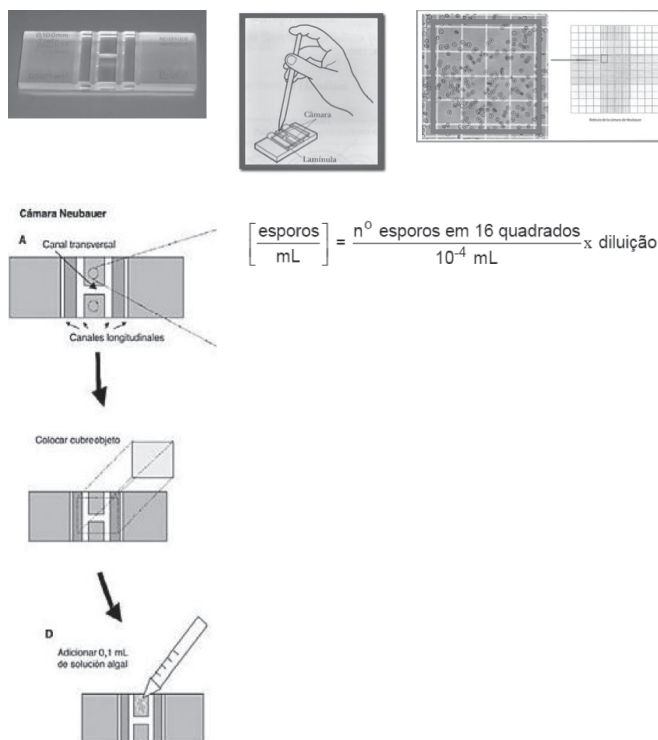


Figura 14.7 Padronização de suspensão esporíca fúngica por contagem direta em câmara de Neubauer.

só meio de cultura e o micro-organismo), devem ser inoculadas em placas de Petri com meio ágar Sabouraud (10 g de peptona, 20 g de dextrose, 15 g de ágar, 1 L de água destilada, pH 5,6) sem quitosana e posteriormente incubadas a 28 °C, por 96 horas, para ser determinada como CFM a menor concentração que não viabilizou o crescimento da cepa teste em meio ágar Sabouraud sem quitosana, como exibido na Figura 14.8⁴⁵.

14.6.3 Interferência da quitosana no crescimento micelial radial fúngico

A inibição do crescimento micelial radial do patógeno deve ser determinada usando a técnica do envenenamento do substrato de crescimento (diluição em meio sólido). Uma alíquota (5 mm de diâmetro da cultura com 10 dias de crescimento em ágar Sabouraud a 28 °C deve ser colocada no

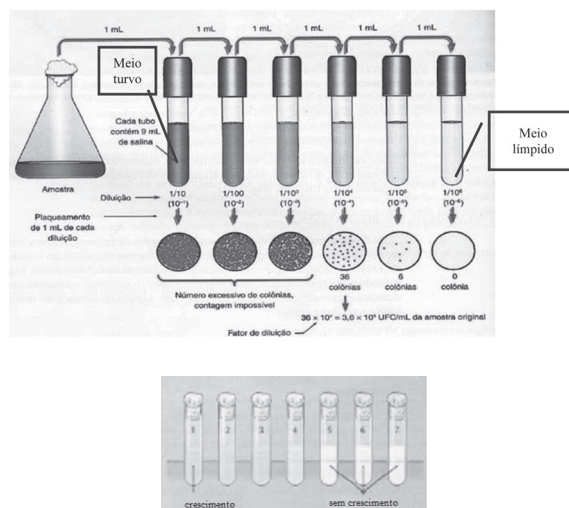


Figura 14.8 Sequência de atividade de diluição e plaqueamento utilizando o método de macrodiluição em série para determinação das concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM).

centro de placas estéreis com meio ágar Sabouraud mais quitosana em diferentes concentrações (exemplo: 2,5 mg/mL; 5,0 mg/mL e 10,0 mg/mL), com base nos resultados da CIM e da CFM.

O sistema deve ser incubado em estufa até que o controle atinja a borda da placa de Petri. Em intervalos de incubação (horas, geralmente 12/12 h ou 24/24 h) são feitas medições do crescimento radial da colônia fúngica (Figura 14.9). O controle mede o crescimento micelial radial sem adição de quitosana²⁰.

Em trabalho realizado em projeto bilateral Brasil-Portugal (financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES), na Universidade Católica do Porto (no Porto, em Portugal), foi avaliada a inibição do crescimento micelial radial do fungo patogênico *Botrytis cinerea* em função do tempo de crescimento com aplicação de diferentes doses de quitosana de alto e baixo peso molar. Houve efeito significativo das doses aplicadas, e a taxa inibitória mostrou-se diretamente relacionada com a concentração de quitosana, sendo a inibição do crescimento do fungo patogênico mais elevada nas maiores concentrações de quitosana durante o período avaliado. A quitosana pode induzir marcantes alterações morfológicas em hifas durante os diferentes estágios de desenvolvimento, o que

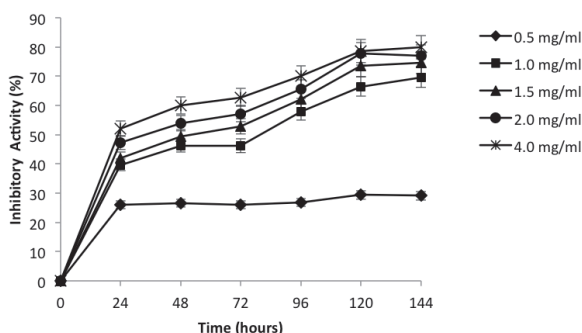


Figura 14.9 Avaliação do efeito da quitosana no crescimento de *Botrytis cinerea* em diferentes concentrações e intervalos de tempo (horas). Ensaio em laboratório realizado na Universidade Católica do Porto (projeto bilateral Brasil–Portugal com financiamento da CAPES). O trabalho foi apresentado na 12th International Conference of Chitin and Chitosan, realizado em Fortaleza em 2012. Em ensaio conduzido para avaliar o crescimento radial do fungo filamentoso *C. gloeosporioides* foi observado que a quitosana na concentração 2,5 mg/mL inibiu o crescimento do fungo em 44% após 2 dias de crescimento, seguida por taxa inibitória de 32%, 29% e 27%, após 3, 4 e 5 dias de crescimento, respectivamente. A concentração 5,0 mg/mL retardou o início do crescimento do fungo em 3 dias com inibição de 87%; após o quinto dia a taxa foi reduzida para 84%; e, na concentração de 10 mg/mL, o polímero inviabilizou o crescimento do fungo por até 19 dias.

permite a sua utilização tanto para prevenir a contaminação de alimentos como no controle de infecções já instaladas.

14.6.4 Prolongamento da vida de prateleira de alimentos

A utilização de revestimento com quitosana pode ampliar a vida de prateleira de frutos ao promover uma atmosfera modificada que altera o ar circulante e interno, reduzindo os níveis de O_2 , aumentando os níveis de CO_2 , retardando a perda de água e retardando o aumento da atividade das polifenoloxidase (PPO), com consequente redução do metabolismo vegetal e retardo da senescência ao longo do armazenamento. O aumento da vida útil das frutas em temperaturas superiores às de refrigeração é desejável, uma vez que a quase totalidade dos frutos comercializados no Brasil, tanto no atacado quanto no varejo, não são submetidos a temperaturas adequadas. A conservação nessas condições pode facilitar o transporte a longas distâncias e ampliar o período de comercialização^{10,5}.

14.6.5 Preparo do gel de quitosana

Para uso em testes em alimentos a quitosana deve ser diluída em ácido acético 1%, ou também pode ser diluída no próprio suco da fruta a ser avaliada se este for ácido, por exemplo, suco de acerola.

As diluições devem ser procedidas para obtenção de solução inicial de quitosana na concentração de 20 mg/mL (diluir 2 g de quitosana em 100 mL do ácido). As soluções de quitosana devem ter o pH ajustado para 5,5, com hidróxido de sódio a 4%, sob constante agitação.

A quitosana pode ser utilizada para revestimento de frutos, como cobertura comestível. Após preparo da solução de quitosana, que, dependendo do peso molar do polímero, pode ficar como gel, o fruto é imerso ou a quitosana é aspergida no fruto. A Figura 14.10 mostra o gel de quitosana e a imersão de morangos no gel. Depois da imersão, o fruto é retirado do gel ou solução de quitosana e posto para secar. Esse procedimento pode ser realizado mais de uma vez no mesmo fruto para proporcionar um recobrimento mais espesso e uniforme.

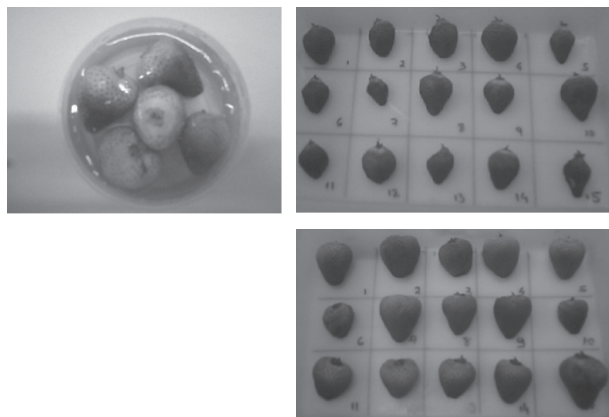


Figura 14.10 Morangos imersos no gel de quitosana a 10 mg/mL (quitosana solubilizada em ácido acético 1%), por 3 minutos, secos e verificada a perda de massa após 15 dias de vida de prateleira sem quitosana (A) e recobertos com quitosana (B).

Em frutos armazenados em temperatura ambiente (25-28 °C), foi verificado que o revestimento com quitosana no oitavo dia de armazenamento apresentou percentual de incidência de podridões dez vezes menor do que sem revestimento, comprovando a ação antimicrobiana desse polímero. Já

em relação à cor da casca e polpa, esse mesmo revestimento é capaz de manter a cor inicial dos frutos e a polpa mais firme que os demais tratamentos³². Redução na mancha preta em laranja tratada com quitosana foi verificada por Rappussi e colaboradores⁴⁰ e Sharma e colaboradores⁴². Essa ocorrência provavelmente é devida ao efeito germicida do polímero sobre o patógeno, bem como à indução de resistência no tecido vegetal⁵³.

14.7 CONCLUSÕES

A quitosana possui características químicas que possibilitam seu emprego em várias áreas de atuação, tais como agricultura, conservação de alimentos, saúde e proteção ambiental. Para a utilização eficaz da quitosana, são necessários conhecimentos básicos e, principalmente, a realização de análises para a real caracterização das diferentes formas de quitosana, que podem apresentar vários graus de utilização de maneira efetiva, principalmente com relação à forma de desacetilação e à forma de apresentação (baixo, médio e alto peso molar).

Com referência ao uso da quitosana na agricultura, o trabalho do nosso grupo de pesquisa em Ciências dos Solos mostra uma forma bastante interessante para a produção de fertilizante efetivo e de bioprotetor contra doenças de plantas. O bioprotetor (PNPK) produzido com biofertilizante de rochas mais *Acidithiobacillus* e material orgânico enriquecido com nitrogênio por inoculação com bactéria diazotrófica e com quitosana fúngica pode ser usado como fonte de nutrientes para incrementar o crescimento e produtividade das plantas, e, de forma direta, pode ser utilizado para proteção contra fitopatógenos. Também é interessante observar que a quitosana na forma nano apresenta grande potencial para uso como bioprotetor por aplicação via foliar. O biofertilizante e bioprotetor com quitosana é alternativa viável para substituir fertilizantes solúveis que promovem contaminação ambiental, além de poder ser utilizado como alternativa a uso de produtos químicos contra doenças fitopatogênicas.

14.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente capítulo, demonstramos a importância da caracterização e da análise química das diferentes quitosanas para a sua eficiente utilização nas diferentes áreas do conhecimento.

Fica evidenciada a utilização da quitosana fúngica na produção de bioprotetor pela participação direta, sem o uso de processo químico, já que o fungo possui quitosana na sua parede celular. A quitosana é então adicionada ao biofertilizante produzido a partir de rochas e matéria orgânica enriquecida em N por ação de bactéria diazotrófica.

O bioprotetor tem participação direta na nutrição das plantas, por sua atuação com liberação gradual, que também pode promover proteção ambiental, tendo em vista que reduz a possibilidade de percolação de elementos nocivos para as camadas mais profundas do solo e para o lençol freático.

Também é interessante observar a possibilidade da utilização da quitosana na forma de nanopartículas, que tem potencial para aplicação via foliar, visando à defesa da planta contra patógenos.

Na indústria de alimentos, a utilização de gel de quitosana pode promover a inibição de patógeno pós-colheita através da redução do crescimento micelial radial e de alterações ultraestruturais nas hifas e esporos. A aplicação de cobertura com quitosana em frutos minimamente processados promove a ocorrência de parâmetros físico-químicos e microbiológicos mais uniformes ao longo da vida de prateleira.

Observa-se diferença significativa em função da temperatura de armazenamento e do peso molar da quitosana, que podem atuar de formas diferentes em virtude do menor e maior peso molar do biopolímero. Portanto, é demonstrado o potencial da quitosana como tecnologia alternativa de conservação de alimentos em virtude da redução de alterações fisiológicas, resultando em expansão da vida de prateleira de frutos minimamente processados.

A aplicação da quitosana como agente natural pode surgir como alternativa na minimização dos danos decorrentes da resistência fúngica aos agentes classicamente empregados no controle do crescimento de fungos patogênicos em frutas e sucos. Esses fatos repercutem no nível de abastecimento do mercado nacional e internacional, no custo de produção, bem como na qualidade e segurança dos produtos da agroindústria.

A condução de pesquisa com quitosana subsidiará a disponibilidade de informações científicas correntemente escassas na área do estudo da potencialidade antimicrobiana de produtos naturais de possível uso em frutos e sucos, com repercussão na garantia da sanidade e qualidade da cadeia produtiva, inserida entre as necessidades do setor agropecuário, para viabilizar o incremento da sua competitividade nos mercados nacional e internacional. Os estudos com quitosana também podem contribuir para a proteção do

meio ambiente, para a segurança alimentar, para a saúde pública e para o desenvolvimento econômico e social.

14.9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora seja difícil determinar a total magnitude da economia com a utilização de biofertilizantes naturais, estes são amplamente reconhecidos na agricultura, bem como nas significativas perdas pós-colheita devido à deterioração microbiana. As perdas pós-colheita variam bastante, mas é conhecido que até 25% da produção mundial de vegetais está sujeita ao ataque de micro-organismos em países industrializados, enquanto em países em desenvolvimento esse dano é mais alto, podendo atingir até 50% da produção.

O uso de fertilizantes minerais solúveis e de antimicrobianos no mundo varia, embora estimativas apontem que anualmente milhões de quilos desses compostos sejam aplicados a frutas e vegetais, sendo geralmente aceitos e difundidos pelos produtores. Contudo, os aspectos de poluição ambiental, efeitos sobre alimentos e efeitos colaterais em humanos são os principais fatores que têm restringido o uso de antimicrobianos químicos no controle de patógenos pré e pós-colheita.

Os métodos biológicos constituem alternativas viáveis em relação aos métodos químicos tradicionais para produção de fertilizantes e antimicrobianos, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos, sendo ecologicamente viáveis, normalmente seguros e poderem prover proteção por um longo prazo para a cultura, com redução substancial na contaminação ambiental.

Espera-se que a aplicação da quitosana como protetor de doenças de plantas e antifúngico natural promova aumento na qualidade dos frutos e dos sucos e venha a atender à atual demanda do mercado consumidor por alimentos submetidos a um mínimo de processamento e livres da incorporação de agentes químicos.

Assim, podemos considerar a ampla importância e real viabilidade do uso da quitosana, assim como as perspectivas para produção e utilização dos resultados dos trabalhos de pesquisa, que, com certeza, serão usados de forma direta pelas indústrias relacionadas com a produção e comercialização dos produtos agrícolas. Esse fato deverá ser de grande importância para a sociedade brasileira, inclusive em função das patentes que já foram apresentadas atualmente pela Universidade Federal de Pernambuco e pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

1. Amorim RVS, Campos-Takaki GM, Ledingham WM, et al. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005;1:19-23.
2. Amorim RVS, Souza W, Fukushima K, Campos-Takaki GM. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Braz J Microb*. 2001;32: 20-3.
3. Andrade VS, Neto BB, Fukushima K, Campos-Takaki GM. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) – A factorial study. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:149-53.
4. Andrade MMM, Stamford NP, Freitas ADS, Santos CERS, Sousa CA, Lira Junior MA. Effects of biofertilizer with diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungi on the soil attribute, cowpea nodulation, yield and nutrient uptake in field conditions. *Sci Horticult*. 2013;161:374-9.
5. Apail W, Sardud V, Boonprasom P, et al. Effects of chitosan and citric acid on pericarp browning and polyphenol oxidase activity of longan fruit. *Songklanakarin J Sci and Technol*. 2009;31:621-8.
6. Avadi MR, Sadeghi AMM, Tahzibi A, Bayati KH, Pouladzadeh M, Zohuriaan-Mehr MJ, Rafiee-Tehrani M. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. *European Polymer J*. 2004;40:1355-61.
7. Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: Aplicações como biomateriais. *Rev. Eletron Mater Proces*. 2007;2:27-34
8. Azevedo JR, Sizilio RH, Brito MB, Costa AMB, Serafini MR, Araújo AAS, Santos MRV, Lira AAM, Nunes RS. Caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana-TPP contendo insulina. VII Congresso Brasileiro de análise Térmica e Calorimetria. São Paulo; 2010.
9. Barreteau H, Delattre C, Michud P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technol Biotechnol*. 2006;44:323-33.
10. Basseto E., Jacomino AP, Pinheiro AL. Conservation of “Pedro Sato” guavas under treatment with 1-methylcyclopropene. *Pesq Agropec Brasileira*. 2005;40:433-40.
11. Berger J, et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur J Pharmaceut Biopharmaceut*. 2004;57:35-52.
12. Berger LRR, Stamford TCM, Stamford NP. Perspectivas para uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2011;2:195-215.
13. Berger LRR, Stamford NP, Santos CERS, Santiago AD, Franco LO, Stamford, TCM. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter

inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. J Soil Sci Plant Nutr. 2013;13:592-693.

14. Borderías AJ, Sánchez-Alonzo I, Pérez-Mateos M. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. Trends Food Sci Technol. 2005;16:458-65.

15. Borgognoni CF, Polakiewicz B, Pitombo RNM. Estabilidade de emulsões de D-limoneno em quitosana modificada. Ci Tecnol Aliment. 2006;26:502-8.

16. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. Pharm Res. 1997;14:1431-6.

17. Campos-Takaki GM. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: Dutta PK, editor. Chitin and chitosan opportunities and challenges. India: International Publication; 2005.

18. Canella KMNC, Garcia RB. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. Química Nova. 2001;24:13-7.

19. Coma V, Martial-Gros A, Garreau S, Copinet A, Salin F, Deschamps A. Edible antimicrobial films base don chitosan matrix. J Food Sci. 2004;67:1162-9.

20. Daferera JD, Ziogas NB, Polissiou GM. GC-MS analysis of essential oils from some Greeks aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicilliumdigitatum*. J Agric Food Chem. 2000;48:2576-81.

21. Fai AEC, Stamford TCM, Stamford TLM. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2008;9:435-51.

22. Franco LO, Maia RCC, Porto ALF, Messias AS, Fukushima K, Takaki GMC. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). Braz J Microbiol. 2005;35:243-7.

23. Franco LO, Albuquerque CDC, Stamford NP, Lima MAB, Takaki CGM. Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorganico em amostras de *Cunninghamella elegans*. Analytica. 2011;54:70-8.

24. Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2007;59:24-34.

25. Harish Prashanth KV; Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. Trends in Food Sci Technol. 2006.

26. Hesseltine CW, Anderson RF. Macrobiological production of carotenoides I. Zygospore and Carotene produced by intraspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. Mycol. 1957;149:449-52.

27. Li Y, Chen XG, Liu N, Liu CS, Liu CG, Meng XH, Yu LJ, Kenedy JF. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydr Polym.* 2007;67:227-32.
28. Liu G, Shao L, Ge F, Chen J. Preparation of ultrafine chitosan particles by reverse microemulsion. *China Partic.* 2007;5:384-30.
29. Lima IS, Ribeiro ES, Airoidi C. O emprego de quitosana modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. *Química Nova.* 2006;29:501-6.
30. Lima RCM, Stamford NP, Santos ERS, Dias SHL. Rendimento da alface e atributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. *Braz J Horticult.* 2007;25:224-9.
31. Lima FS, Stamford NP, Sousa CS, Lira Junior MA, Malheiros SMM, Van Straaten P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26:1769-77.
32. Liu J, Tian S, Meng X, Xu Y. Effects of chitosan on control of postharvest disease and physiological responses of tomato fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 2007;4:300-6.
33. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles: A review. *Trop. J. Pharmaceut Res.* 2006;5:561-73.
34. Moura PM, Stamford NP, Duenhas LH, Santos CERS, Nunes GHAS. Eficiência de biofertilizantes de rochas com *Acidithiobacillus* em melão, no vale do São Francisco. *Braz J Soil Sci.* 2007;2:1-7.
35. Nadarajah K, Kader J, Mohd M, Paul DC. Production of chitosan by fungi, J. *Biological Sci.* 2001;4:263-5.
36. Nemtesev SV, Zueva OIU, Khismatulin MR, AL'Bulov AL, Varlamov VP. Isolation of chitin and chitosan from honeys bees. *Priki Biokhim Mikrobiol.* 2004;40:46-50.
37. Pochanavanich P, Suntornsuuk W. Fungal chitosan production and its characterization. *Let Appl Microbiol.* 2002;35:17-21.
38. Pedro AS, et al. Chitosan: an option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydr Polym.* 2009;76:501-8.
39. Rabea EI, Badawi MEI, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromol.* 2003;4:1457-65.
40. Rappussi MCC, Pascholati SF, Benato EA, Patricia CIA. Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* postharvest "Valencia" oranges. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2009;52:513-21.
41. Roberts T. Reservas de minerais potássios e a produção de fertilizantes potássicos no mundo. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba. *Informações Agronômicas.* 2004;107:2-3.
42. Sharma N, Tripathi A. Effects of *Citrus sinensis*(L) Isbeckepicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microbiological Research.* 2008;163:337-44.

43. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. 2003;26:726-37.
44. Stamford NP, Moura AMMF, Santos KSR, Santos PR. Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizuserosus*). *Braz J Soil Sci*. 2004;28:75-83.
45. Stamford NP, Lima RA, Santos CERS, Dias SHL. Rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on sugar cane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. *Geomicrobiol J*. 2006;23:261-5.
46. Stamford NP, Santos PR, Santos CERS, Freitas ADS, Dias SHL, Lira Junior, MA. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. *Bioresour Technol*. 2007;98:1311-8.
47. Stamford NP, Andrade IP, Santos CERS, Lira Junior MA, Silva Junior S, Freitas ADS, Van Straaten P. Soil properties and grape yield affected by rock biofertilizers with earthworm compound. *J. Soil Sci Plant Nutr*. 2011;11:79-88.
48. Tsai GJ, Hwang SP. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fisher Scientific*. 2004;70:675-81.
49. Xia W, et al. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloides*. 2011;25:170-9.
50. Yadav AV, Bhise B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. *Current Sci*. 2004;87:1176-8.
51. Yang HC, Wang WH, Huang KS, Hon MH. Preparation and application of nanochitosan to finishing treatment with anti-microbial and anti-shrinking properties. *Carbohydr Polym*. 2010;79:176-9.
52. Yen NM-T, Mau J-L. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT*. 2007;40:472-9.
53. Zhu X, Wang Q, Cao J, Jiang W. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *J Food Proces Preservation*. 2008;32:770-84.

15

CAPÍTULO

IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE

Lívia Tereza de Andrade Souza
Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo
Benevides Costa Pessela João
Marcelo Matos Santoro
Rodrigo R. Resende
Adriano A. Mendes

15.1 INTRODUÇÃO

As exigências atuais por processos industriais sustentáveis que contemplem os princípios da química verde, bem como as limitações existentes na obtenção de produtos ou intermediários específicos de importância industrial, têm tornado a tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais atrativa para a aplicação em diversos ramos industriais. Diferentemente dos catalisadores químicos convencionais, as enzimas são catalisadores naturais altamente específicos e, portanto, capazes de discriminar não somente as reações, como também os substratos (especificidade quanto ao tipo de substrato), partes similares das moléculas (regioespecificidade) e isômeros

ópticos (estereoespecificidade)¹. Além disso, as enzimas exibem uma elevada atividade catalítica sob condições brandas de temperatura, pressão e pH.

O mercado consumidor de enzimas está em expansão. De acordo com a reportagem da Business Communications Company, o valor de venda das enzimas para utilização industrial foi estimado em 5 bilhões de dólares em 2008. As projeções naquela época previam um aumento na taxa de crescimento do mercado de biocatalisadores de aproximadamente 4% a 5% ao ano². Entretanto, essas expectativas foram superadas, e o crescimento da demanda global alcançou taxas de 9,1% ao ano com valor de venda estimado em 6 bilhões de dólares em 2016³.

O uso de catalisadores de alto custo, como as enzimas, requer a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável. Isso é alcançado com a aplicação de enzimas na forma imobilizada. O reúso do biocatalisador somente é possível quando a preparação enzimática é estável o suficiente. A estabilidade requerida também pode ser alcançada pela técnica de imobilização, uma vez que o processo pode alterar as propriedades da própria enzima, produzindo biocatalisadores com elevada atividade, especificidade e estabilidade^{4,5}. Dessa forma, a imobilização enzimática tem sido considerada, nos últimos anos, a técnica mais promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas em larga escala. É importante ressaltar que a técnica pode ser utilizada em conjunto com avanços na área de estabilização de proteínas alcançados pela engenharia de proteína, biologia molecular e biologia computacional.

Existem, hoje, diferentes protocolos de imobilização que se diferenciam quanto ao tipo de suporte e eficiência. Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos, não há um método aplicável para todas as enzimas conhecidas, sendo indispensável o conhecimento prévio das características do suporte e do efeito dos métodos empregados para selecionar a técnica de imobilização a ser utilizada para uma determinada finalidade. Sendo assim, para cada aplicação de um biocatalisador imobilizado é ideal escolher o procedimento mais simples e barato^{4,5}.

15.2 HISTÓRICO

O primeiro relato de uso de enzimas com propósitos industriais data de 1940, com a patente de Langlois e Dale, que objetivou o emprego de amilases para a obtenção de xarope de milho. Entretanto, a aplicação de enzimas em outros processos industriais foi dificultada pela escassa disponibilidade e

elevado custo dos biocatalisadores⁶. Para contornar essa limitação, a comunidade científica direcionou seus estudos para dois focos: o primeiro foi encontrar linhagens microbianas com potencial de produção e secreção das enzimas; o segundo foi desenvolver métodos de tornar a enzima imobilizada para posterior reutilização⁷.

Em 1953, Grubhofer e Schleith descreveram a primeira tentativa de confinar uma enzima em uma matriz insolúvel⁸. O trabalho desses autores foi posteriormente seguido pelo pesquisador Manecke e seus colaboradores, que, a partir de 1955, direcionaram esforços para a descoberta de polímeros a serem utilizados como suportes para a imobilização de enzimas e outras proteínas biologicamente ativas⁹.

Em 1960, a tecnologia enzimática despontou como área de intensa investigação, culminando em 1969, no Japão, com as duas primeiras aplicações industriais de enzimas imobilizadas: a isomerização de glicose em frutose por glicose isomerase, como descrito por Takasaki e colaboradores (1969), e a resolução óptica de aminoácidos com aminoácido acilase, relatada por Chibata e Tosa (1976)^{10,11}.

Ainda na década de 1960, foi inicialmente desenvolvida a técnica de reticulação de enzimas via reação com glutaraldeído por entrecruzamento de grupos amino (NH_2) reativos na superfície da proteína¹². Entretanto, o uso industrial dos cristais de enzima reticulados foi somente iniciado na década de 1990 por cientistas da Vertex Pharmaceuticals¹³ e posteriormente comercializado pela Altus Biologics¹⁴⁻¹⁷. Os estudos iniciais foram realizados com os cristais de enzima reticulados de termolisina para a produção de aspartame, e, subsequentemente, foi demonstrado que esse método pode ser aplicado a diversas enzimas¹⁸.

Apesar do longo histórico da imobilização de enzima, Straathof e colaboradores (2002) estimaram que apenas 20% dos processos biocatalíticos envolvem enzimas imobilizadas¹⁹. No entanto, ao longo dos últimos anos um número interessante de novas metodologias de imobilização enzimática tem sido relatado na literatura e nos pedidos de patentes, indicando que a imobilização de enzimas está em contínua evidência²⁰.

15.3 POR QUE ENZIMAS IMOBILIZADAS?

Os principais problemas da utilização de enzimas solúveis são: alto custo de produção e purificação, instabilidade da estrutura tridimensional quando isoladas do seu ambiente natural e perda de atividade devido às condições

do processo ou inibição pelo substrato ou produto¹. Isto resulta em um tempo de meia-vida operacional curto e, conseqüentemente, um custo elevado. Além disso, muitas enzimas atuam na forma solúvel em meio aquoso (catálise homogênea), na qual contaminam o produto desejado e não podem ser recuperadas do meio reacional na forma ativa¹.

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. No caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos, e pode ser usada isolada ou em combinação com outras técnicas de estabilização de proteínas, considerada uma das ferramentas mais eficientes para alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade das enzimas²¹.

Em comparação com as enzimas solúveis, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos^{20,22}. Outras importantes vantagens das enzimas imobilizadas em comparação com as enzimas solúveis são: possibilidade de reutilização do biocatalisador; facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e de interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão; além da possibilidade de conduzir processos contínuos^{20,22}.

Entretanto, dependendo da relação entre o custo do suporte e a estabilidade do derivado imobilizado, a imobilização, ao invés de reduzir o custo de um determinado processo, pode torná-lo ainda mais oneroso.

15.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, tais como: encapsulação em membranas poliméricas; confinamento em matrizes poliméricas; adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; encapsulação; ligação covalente a uma matriz insolúvel ou por reticulação (Figura 15.1)^{21,23,24}.

Não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas e suas várias aplicações. Isso se deve às diferentes características físico-químicas de cada enzima, às diferentes propriedades dos substratos e produtos e às diversificadas aplicações dos produtos obtidos (Figura 15.2). Além disso, todos os métodos apresentam vantagens e limitações. Conseqüentemente, as condições ótimas de imobilização para uma determinada enzima são determinadas empiricamente pelo processo de erro e acerto, a

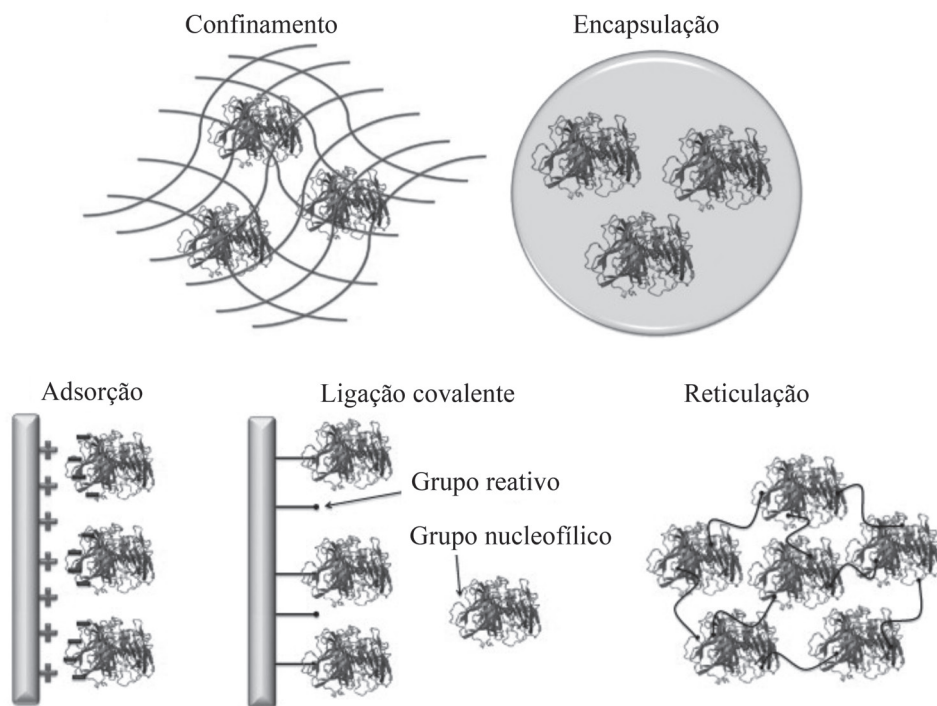


Figura 15.1 Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação. Modificada de Fernández-Fernández et al. (2013)²⁵.

fim de se obter maior retenção da atividade enzimática, estabilidade operacional e durabilidade¹.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como: atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada²²⁻²⁴.

A eficiência de um protocolo de imobilização é determinada levando-se em consideração alguns parâmetros, como^{22,26-30}:

Cálculo da concentração de proteína imobilizada (PI)

A concentração de proteína imobilizada (PI) é quantificada com base na concentração de proteína oferecida e a concentração de proteína presente

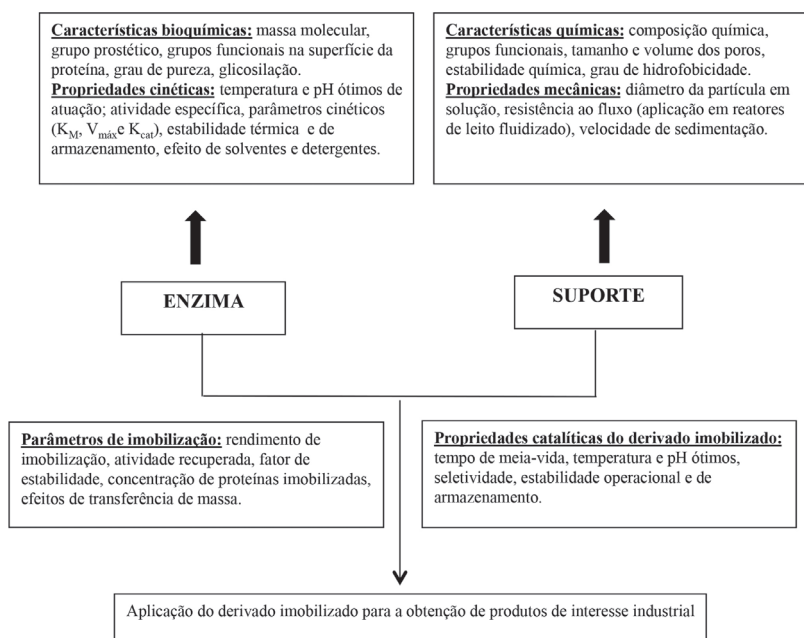


Figura 15.2 Principais parâmetros que devem ser investigados na elucidação de um protocolo de imobilização.

no meio reacional após o processo de imobilização, como mostra a Equação 15.1.

$$(Equação\ 15.1) \quad PI(\%) = \left(\frac{P_0 - P_f}{P_0} \right) \times 100$$

em que PI é a porcentagem de proteína imobilizada; P_0 e P_f são as concentrações de proteínas no tempo inicial e final no sobrenadante (mg. mL^{-1}), respectivamente.

Cálculo da atividade recuperada (AR)

O cálculo da atividade recuperada (AR) é determinado pela relação entre a atividade hidrolítica aparente do derivado, o produto da atividade inicial oferecida e a concentração de enzima imobilizada, conforme mostra a Equação 15.2.

$$(Equação 15.2) \quad AR (\%) = \left(\frac{U_{\text{imobilizado}}}{U_0 - U_f} \right) \times 100$$

em que AR é a atividade recuperada (%); $U_{\text{imobilizado}}$ é a atividade hidrolítica aparente do derivado imobilizado ($U \cdot g^{-1}$ de suporte); U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização ($U \cdot mg^{-1}$ de proteína) e U_f é a atividade no sobrenadante após a imobilização ($U \cdot mg^{-1}$ de proteína) .

Cálculo do fator de estabilidade (FE)

O fator de estabilidade (FE) pode ser calculado pela relação entre o tempo de meia-vida da enzima imobilizada e solúvel:

$$(Equação 15.3) \quad FE = \frac{t_{1/2} \text{ imobilizada}}{t_{1/2} \text{ solúvel}}$$

em que FE é o fator de estabilidade; $t_{1/2}$ solúvel é o tempo de meia-vida para a enzima solúvel e $t_{1/2}$ imobilizada é o tempo de meia-vida para a enzima imobilizada.

Cálculo do rendimento de imobilização (RI)

O rendimento de imobilização (RI) é calculado pela relação entre a atividade enzimática imobilizada pela atividade inicialmente oferecida ao suporte de imobilização:

$$(Equação 15.4) \quad RI (\%) = \left(\frac{U_{\text{imobilizado}}}{U_0} \right) \times 100$$

em que RI é o rendimento de imobilização; $U_{\text{imobilizado}}$ é a atividade enzimática do derivado imobilizado e U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização ($U \cdot mg^{-1}$ de proteína).

De modo geral, as enzimas livres e imobilizadas diferem quanto às suas características bioquímicas e cinéticas. As alterações encontradas são atribuídas a dois fatores principais: (1) mudanças conformacionais em sua estrutura tridimensional, por exemplo, maior ou menor flexibilidade da

proteína adquirida pelo contato com o suporte de imobilização; e (2) natureza heterogênea do microambiente em que a enzima se encontra, no qual as concentrações de substrato, produto e cofator podem ser diferentes da presente na solução⁷.

A natureza hidrofílica ou hidrofóbica dos suportes utilizados, bem como a presença de cargas livres em sua superfície, justificam algumas alterações das propriedades catalíticas das enzimas, como, por exemplo, o pH ótimo de atuação. Portanto, a obtenção de derivados imobilizados com pH ótimo de atuação pode ser diferente do encontrado para a enzima livre. Um exemplo de importância industrial foi encontrado para uma lactase de levedura imobilizada em suporte de vidro revestido com zircônia. Na forma livre, a enzima mostrou-se neutra com pH ótimo entre 6 e 7, porém, quando imobilizada, o pH ótimo de atuação caiu para a faixa de 3 a 4. A redução do pH permitiu o uso da enzima para catalisar a hidrólise de lactose em soro de queijo ácido, aplicação na qual a enzima livre é inadequada devido às condições reacionais⁷.

A imobilização da enzima pode produzir diferentes efeitos na sua atividade e seletividade. A proteína pode ser distorcida, principalmente se interações múltiplas entre a enzima e o suporte ocorrerem. O sítio ativo pode ser bloqueado ou ainda a imobilização pode promover problemas difusionais²⁶. Outro efeito da imobilização é o aumento da estabilidade da proteína devido à estabilização da estrutura proteica, ou simplesmente porque o derivado imobilizado é menos acessível a agentes desnaturantes e ataques microbianos⁷.

Durante o processo de imobilização, deve-se atentar para algumas questões como: mudanças conformacionais da estrutura da enzima que levem à sua imobilização para uma forma inativa; perda da atividade catalítica e dessorção de moléculas de enzima do microambiente do suporte; efeitos difusionais em decorrência de limitações do acesso de moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima e do produto para o meio reacional. Além disso, o custo da imobilização deve ser compensado pela vida útil do biocatalisador^{21,22}.

As seções seguintes relatam as principais características dos métodos de imobilização de enzimas: adsorção, ligação covalente, confinamento/encapsulação e reticulação, bem como suas principais vantagens e desvantagens.

15.4.1 Adsorção física

A adsorção é um método simples e muito empregado para imobilização de enzimas. Neste método, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio de

ligações como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas^{25,27,28}. Nas reações conduzidas em meio orgânico, não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte. Nessas condições, a enzima é insolúvel no meio apolar e a adsorção física pode ser um método bastante vantajoso²⁹.

As principais vantagens da imobilização por adsorção residem na facilidade e simplicidade da técnica e no baixo custo associado a não necessidade de ativação do suporte e na possibilidade de reutilização do suporte após vários ciclos. Além disso, a adsorção promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável²⁷.

Como desvantagens, tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica^{20,22,30,31}. Contudo, técnicas foram desenvolvidas a fim de reduzir a dessorção da enzima, como, por exemplo, a modificação química do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros^{32,33}. Outros estudos sugerem que a hidrofobização do suporte pode resultar na redução da lixiviação e melhoria da atividade enzimática³⁴.

Dentre as enzimas imobilizadas por essa técnica, o mecanismo de imobilização das lipases em suportes hidrofóbicos é o mais conhecido, e baseia-se nas particularidades estruturais da enzima (Figura 15.3)^{21,35}. As lipases apresentam duas diferentes configurações: uma forma fechada, considerada inativa, na qual o contato entre o sítio ativo e o meio reacional é bloqueado por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica chamada de tampa (*lid*); e a forma aberta, na qual essa tampa é deslocada e o sítio ativo é totalmente exposto ao meio de reação. Na presença de uma superfície hidrofóbica, a molécula de lipase sofre uma mudança conformacional e o equilíbrio é deslocado para a conformação aberta. Nesse caso, a região do sítio ativo da enzima interage com o suporte por adsorção hidrofóbica, uma vez que o reconhece como similar aos seus substratos naturais (gotas de óleo). Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação ativa por um mecanismo exclusivo denominado “ativação interfacial”³⁵⁻³⁸.

Fernández-Lorente e colaboradores³⁵ estudaram a imobilização por adsorção de lipases de *Candida antarctica* tipo B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL) em diferentes suportes hidrofóbicos (hexil- e butil-*toyoppearl* e butil- e octil-agarose), e obtiveram resultados interessantes. Os autores verificaram que o tipo de suporte e a fonte da enzima influenciaram a atividade dos derivados

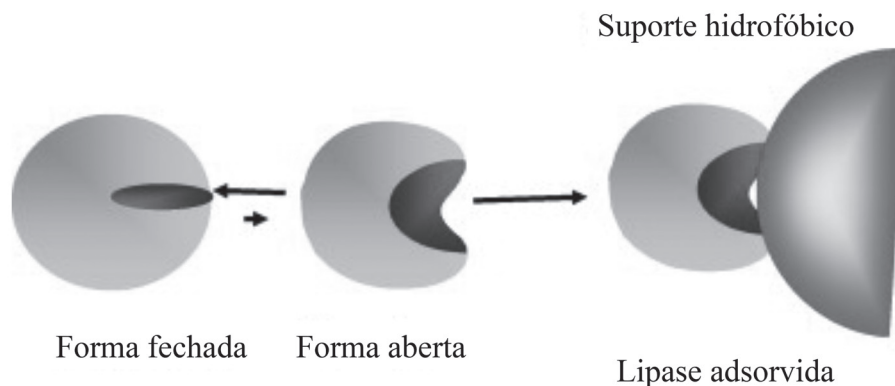


Figura 15.3 Imobilização de lipases por adsorção hidrofóbica. A exposição da porção hidrofóbica da enzima a um meio hidrofílico (por exemplo, um tampão aquoso) é desfavorável; assim, a lipase em meios homogêneos aquosos estará principalmente na forma fechada. No entanto, a forma aberta é facilmente adsorvida sobre a superfície hidrofóbica, mesmo a uma força iônica muito baixa (ativação interfacial).

imobilizados obtidos, tendo sido verificado um aumento na atividade enzimática para todas as enzimas quando imobilizadas no suporte octil-agarose, especialmente para a lipase LTL (sete vezes). A maior atividade hidrolítica observada para as lipases imobilizadas no suporte octil-agarose em detrimento das imobilizadas no suporte do tipo *toyopearl* pode estar relacionada à morfologia e elevada área superficial do suporte agarose. Os autores também propuseram que os suportes do tipo *toyopearl* promoveram um bloqueio parcial do sítio ativo das lipases e dos seus grupos hidrofóbicos circunvizinhos. Neste trabalho, ainda foram investigadas as concentrações de tensoativos necessárias para a dessorção das enzimas dos suportes. Curiosamente, a concentração de tensoativo necessária para a dessorção total da enzima do suporte octil-agarose foi inferior à concentração necessária para a dessorção nos suportes hexil e butil-*toyopearl*.

Além da utilização para a imobilização de enzimas, a técnica de adsorção física é também utilizada para a imobilização de outras biomoléculas, como por exemplo, anticorpos, com a vantagem da possível reutilização do suporte após a perda da sua capacidade de reconhecimento. Devido à possibilidade de dessorção das biomoléculas, a estratégia de adsorção por troca iônica apresenta limitações quando o complexo suporte-biomolécula é empregado em soluções salinas (exemplo: fluidos biológicos). Neste caso, a adsorção hidrofóbica é recomendada para melhorar a estabilidade do complexo³⁹.

15.4.2 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente consiste na ligação da enzima ao suporte por ligações covalentes. A força dessa ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez na sua estrutura^{21,40,41}. Essa rigidez pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros^{21,40,41}.

Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas⁴²⁻⁴⁵.

Os protocolos para a imobilização covalente da enzima frequentemente se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos²⁵.

Geralmente, o glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na ativação de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis^{21,46,47}. Nesse caso, a molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos (α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de amina química), que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff^{21,21,47}. Outros grupos funcionais da enzima, como grupos carboxilatos de moléculas de aspartato e glutamato, grupo fenólico da tirosina, grupo sulfídrico da cisteína, grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina, grupo imidazol da histidina e grupo indol do triptofano, também podem se ligar covalentemente aos grupos reativos do suporte. O número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima depende da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais tanto da enzima quanto do suporte e do estado de protonação dos mesmos, bem como da especificidade dos grupos ativos do suporte^{20,25,48,49}. A diversidade de suportes com grupos funcionais capazes de promover ligações covalentes, ou suscetíveis à ativação, torna esse método de imobilização aplicável em muitas situações. Contudo, a seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de imobilização⁵⁰. As principais vantagens desse método residem em maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e incubação em solventes orgânicos e o fato de a enzima não ser desorvida do suporte^{21,25,47,51}. Inconvenientes da técnica estão relacionados à

parcial inativação e/ou redução da atividade catalítica da enzima devido à alteração em sua conformação nativa impostas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte⁴⁹.

15.4.3 Reticulação

A reticulação de enzimas foi primeiramente descrita por Quiocho e Richards, em 1964, com o objetivo de estabilizar cristais de enzimas para estudos de difração de raios X. Os autores empregaram um agente bifuncional, como o glutaraldeído, e observaram a formação de cristais de enzima insolúveis com elevada atividade catalítica (cerca de 30% a 70% em comparação aos cristais de enzimas nativas)^{12,28,52-54}.

De acordo com a literatura especializada, diversos estudos têm sido realizados visando à obtenção de enzimas imobilizadas livres de suportes. Na maioria dessas abordagens, os derivados imobilizados são diretamente preparados a partir da reação de reticulação entre um agente reticulante e diferentes preparações enzimáticas, tais como a enzima solubilizada⁹,

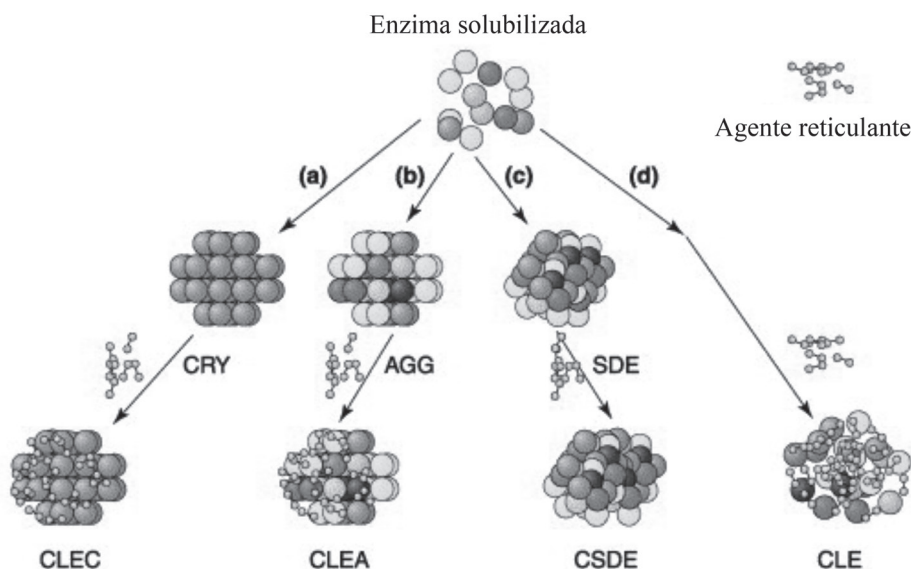


Figura 15.4 Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização; (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta. CRY, cristais de enzima; AGG, agregados enzimáticos; SDE, enzima atomizada; CLECs, cristais de enzima reticulados; CLEAs, agregados enzimáticos reticulados; CSDEs, enzimas atomizadas reticuladas; CLEs, enzimas solubilizadas reticuladas. Figura modificada de Cao et al. (2003)⁶⁰.

cristalizada^{55,56}, atomizada⁵⁷ e agregada^{58,59}, que ao final da reticulação resulta na formação de reticulados de enzimas (*cross-linked enzyme* – CLE), cristais de enzima reticulados (*cross-linked enzyme crystals* – CLEC), enzimas atomizadas reticuladas (*cross-linked spray-dried enzyme* – CSDE) e agregados enzimáticos reticulados (*cross-linked enzyme aggregates* – CLEA) (Figura 15.4). Essa aborgadem oferece vantagens como atividade enzimática altamente concentrada no catalisador, alta estabilidade e baixos custos de produção decorrentes da exclusão de um suporte sólido^{18,60}.

O agente de reticulação é uma molécula que tem pelo menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos na superfície da enzima. Os reagentes de reticulação disponíveis comercialmente podem ser classificados quanto aos grupos reativos presentes em suas extremidades (homobifuncional e heterobifuncional), a especificidade de seus grupos reativos, o comprimento do braço espaçador (*space arm*), solubilidade e reatividade⁶¹⁻⁶³.

A seguir será apresentada uma breve descrição dos mais empregados métodos de imobilização enzimática sem a presença do suporte.

Cristais de enzimas reticuladas (cross-linked enzyme crystals – CLECs)

A obtenção dos CLECs envolve a precipitação controlada de enzimas em microcristais seguida de reticulação por meio do uso de reagentes bifuncionais, para a formação de ligações covalentes entre os grupos reativos de aminoácidos livres na superfície dos cristais de enzima. Após a reticulação, os CLECs são insolúveis em solução tampão e em solvente orgânico, o que permite suas aplicações em diferentes meios reacionais, sem perdas significativas de suas atividades catalíticas. Em seguida, os CLECs podem ser recuperados e reutilizados^{64,65}.

Além disso, a reticulação também proporciona maior estabilidade mecânica e térmica aos CLECs⁶⁶, visto que, nesse tipo de imobilização, os cristais de enzimas são estabilizados pelas ligações cruzadas em toda sua estrutura tridimensional, enquanto em imobilizações enzimáticas convencionais a enzima está ligada pontualmente à superfície bidimensional do suporte⁶⁴.

Os CLECs possuem diferentes tamanhos, que podem variar de 1 µm a 100 µm, uniformidade do volume de cristais e, quando liofilizados, podem ser armazenados por longos períodos de tempo (de meses a anos), o que os torna ainda mais atraentes do ponto de vista comercial¹⁸.

Na literatura, são relatados diferentes protocolos para a preparação de CLECs a partir de diversas enzimas de interesse industrial, como termolissina⁶⁷, ciclodextrina glicosiltransferase⁶⁸, lipase de pâncreas de porco⁶⁹, glicocamilase⁵⁶, lacase⁷⁰, dentre outras, para posterior aplicação na síntese de peptídeos, ciclodextrina, laurato de laurila, hidrólise do amido e no desenvolvimento de biossensores.

Apesar dessa técnica de imobilização resultar em elevada atividade catalítica por volume de meio reacional, uma desvantagem inerente aos CLECs é o requerimento de cristalização da enzima antes da reticulação, o que é, frequentemente, um processo complexo e requer a aplicação da enzima em sua forma pura, o que torna também, o processo bastante oneroso^{18,71}.

Agregados de enzima reticuladas (cross-linked enzyme aggregates – CLEAs)

Os CLEAs foram inicialmente desenvolvidos por Cao e colaboradores em 2000 como uma alternativa aos CLEs e CLECs, na tentativa de contornar seus inconvenientes⁷².

A síntese dos CLEAs envolve a precipitação da enzima (sem a necessidade destas estarem em sua forma pura), seguida de sua reticulação química por meio do uso de um reagente bifuncional, geralmente o glutaraldeído, resultando em agregados enzimáticos insolúveis^{18,73}.

A precipitação das enzimas é comumente induzida pela adição de agentes precipitantes tais como sais, ácidos, solventes orgânicos e polímeros não iônicos, na solução contendo a enzima, sem a perturbação de sua estrutura tridimensional ativa^{18,60,72}.

Os agregados enzimáticos formados a partir da precipitação da solução da enzima são estruturas supramoleculares, da ordem de 0,1 µm a 1 µm, unidas por ligações não covalentes¹⁸.

A eficiência da reticulação da enzima e a estabilidade dos CLEAs depende, principalmente, da concentração de resíduos lisina e aminoterminal na superfície da enzima. Enzimas que possuem concentração de grupos aminorreativos em sua superfície apresentam uma reticulação inadequada. Consequentemente, pode ocorrer a formação de CLEAs frágeis, o que resulta na dessorção de moléculas da enzima após sucessivos ciclos¹⁸.

Wilson e colaboradores (2004) demonstraram que a coprecipitação de enzimas com polímeros iônicos antes da reticulação pode melhorar a formação de CLEAs⁷⁴. A polietilenoimina (PEI) é um polímero catiônico, solúvel

em água e que apresenta em sua estrutura uma elevada densidade de grupos aminoterminais. A coprecipitação da enzima com PEI permite que extensões estreitas da cadeia polimérica (contendo grupos aminoterminais) se aproximem de outros grupos amino presentes na estrutura da enzima (que não estão acessíveis no processo de reticulação convencional), favorecendo a ligação cruzada entre eles^{75,76}. Além disso, a coprecipitação com polímeros iônicos também pode proporcionar excelente efeito estabilizante sobre a enzima por meio da alteração do seu microambiente^{74,77}.

Diversos pesquisadores também têm empregado essa técnica de imobilização como uma estratégia para a estabilização de enzimas multiméricas, uma vez que o processo de reticulação da enzima pode prevenir a dissociação de suas subunidades, e, conseqüentemente, a perda de sua atividade catalítica^{73,78}.

Na literatura, é relatada a preparação de CLEAs de diversas enzimas, tais como papaína⁷⁹, L-aminoacilase⁸⁰, penicilina G acilase⁷⁴, lipases^{59,64,81-83}, β -galactosidase⁸⁴ e lacase⁸⁵, incluindo as que dependem de um cofator, como oxidorredutases e liases¹⁸, proporcionando catalisadores estáveis e com elevada atividade catalítica. Essa técnica também tem sido utilizada para a preparação de combi-CLEAs, a partir da reticulação de diferentes tipos de enzimas, para a catálise de múltiplas reações⁸⁶ ou processos em série¹⁸.

No entanto, há uma necessidade de estudos aprofundados em relação à morfologia dos CLEAs, principalmente no que diz respeito ao formato, porosidade e tamanho dos agregados e sua relação com a atividade catalítica, uma vez que os CLEAs podem formar grandes aglomerados (*clusters*) e, com isso, ocasionar limitações difusionais do substrato e do produto no microambiente do biocatalisador. Conseqüentemente, torna-se fundamental o conhecimento e controle dos fatores que influenciam a morfologia do CLEAs, a fim de se produzir partículas catalíticas bem definidas e com elevada atividade^{18,24,64,65}.

15.4.4 Encapsulação/Confinamento

A imobilização de enzimas por confinamento ou encapsulação envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. À medida que a polimerização prossegue, a matriz polimérica se forma em torno da enzima, confinando-a em sua estrutura⁸⁷⁻⁸⁹. O método de encapsulação é baseado na inclusão das proteínas em estruturas poliméricas com tamanho de poros que permite a difusão dos

substratos e produtos e bloqueia a passagem da proteína. Como não existe uma ligação entre a enzima e o suporte, não há perda de atividade devido à inativação ou distorção do sítio ativo, como frequentemente é observado na imobilização por ligação covalente⁷.

A vantagem da utilização desse método é que o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação, por exemplo, por solventes orgânicos. Além disso, esse é o método de imobilização mais fácil de proceder e pode ser empregado para imobilizar um ou mais tipos de proteína com qualquer grau de purificação, além de não promover alterações estruturais nestas^{7,20,23,65}.

Como desvantagens, têm-se as dificuldades associadas, como o controle do tamanho dos poros do suporte, a dessorção da enzima devido aos diferentes tamanhos de poros e inconvenientes de limitações de transferência de massa e difusão dos substratos pelos poros da matriz^{5,20,22,23,25,87,89-91}. Outra desvantagem é que muitos precursores utilizados para a polimerização das matrizes podem inativar as enzimas⁸⁹.

As enzimas têm sido imobilizadas dentro de microcápsulas, lipossomas, fibras e matrizes constituídas de diferentes matérias produzidas especialmente pela técnica sol-gel^{5,20,22,23,25,87,89-91}.

15.5 TIPOS DE SUPORTES

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte e, apesar de existirem diferentes materiais que podem ser aplicados na imobilização de enzimas, a sua escolha dependerá, essencialmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada⁴¹.

De modo geral, os requisitos básicos para um material ser considerado um suporte adequado são: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes em sua superfície, dentre outras^{21,22,92}.

De acordo com sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, podem ser porosos, não porosos e de estrutura em gel^{21,22}.

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem uma elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. Contudo,

é importante atentar para o diâmetro dos poros do suporte, pois estes devem ser suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato²³.

Como inconveniente do uso dos suportes porosos têm-se possíveis problemas relacionados a limitações difusionais, uma vez que o substrato, além de se difundir da solução para a superfície externa, deverá difundir-se também para o interior dos poros do suporte, onde grande parte das moléculas do catalisador está situada. Todavia, a localização das moléculas de enzimas no interior dos poros também confere uma proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional²¹⁻²³.

Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com moléculas de substrato. No entanto, a pequena área superficial exibida por esses suportes é sua mais notória desvantagem²¹⁻²³. Na tentativa de contornar esse problema, muitos pesquisadores têm optado pela utilização de partículas ou fibras finas⁹³⁻⁹⁵; porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam esses tipos de materiais como, por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos²¹⁻²³.

Os materiais orgânicos, em especial os polímeros, que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte de acordo com as características desejadas, porém os polímeros naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente têm baixo custo e são facilmente degradáveis, não causando danos ao meio ambiente⁹⁶.

Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas destacam-se os orgânicos naturais agarose e quitosana, resinas acrílicas comerciais (polímeros sintéticos) toyopearl e Sepabeads e os nanomateriais considerando o grande número de trabalhos publicados^{21,97-101}.

Agarose

A agarose é uma mistura de moléculas de ágar com um conteúdo menor de cargas e, portanto, com maior capacidade de gelificação. Possui as seguintes propriedades: (1) pouca quantidade de grupos eletronegativos (fundamentalmente sulfatos e ácido pirúvico), resultando num polissacarídeo

bastante inerte e adequado para técnicas cromatográficas; (2) fácil dissolução aquosa; (3) excelente transparência óptica tanto nas regiões de espectro visível quanto na região do ultravioleta, que permite uma melhor quantificação por técnicas espectrofotométricas; (4) estrutura macroporosa, na qual é possível variar o tamanho do poro; (5) fácil ativação e derivatização do suporte; e (6) ausência de toxicidade¹⁰². A agarose é um biopolímero bastante utilizado na separação de moléculas de ácidos nucleicos de diferentes tamanhos¹⁰³. A eletroforese em gel de agarose é uma das ferramentas mais utilizadas para a verificação da qualidade (pureza e quantidade) de DNA ou RNA de uma amostra, assim como para a purificação desses ácidos nucleicos. Nesta, o DNA de interesse é separado dos demais contaminantes (outras moléculas de DNA de diferente tamanho). A baixa resistência a altas temperaturas pode ser superada pelo entrecruzamento entre as moléculas do polímero com epícloridrina. Altos graus de entrecruzamento implicam maior resistência mecânica e redução do tamanho dos poros. É um dos suportes mais utilizados na imobilização de enzimas. Diversas publicações relatadas na literatura mostram a aplicação desse suporte para a imobilização multipontual de enzimas de diversas procedências¹⁰⁶⁻¹⁰⁷.

Quitosana

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose¹⁰⁸. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado. Esse biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais¹⁰⁹. Grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral dos biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH_2) na estrutura da quitosana. Esse biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais¹¹⁰. A Figura 15.5 mostra a estrutura química dos biopolímeros celulose, quitina e quitosana.

A quitina é frequentemente obtida de exoesqueletos de crustáceos como, por exemplo, caranguejo e camarão. O biopolímero é adicionado a uma

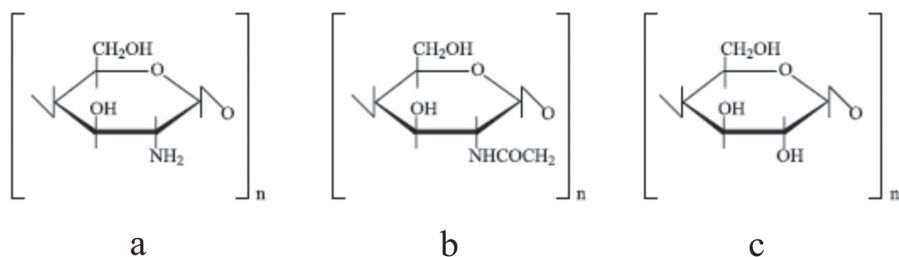


Figura 15.5 Estrutura dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b), e celulose (c).

solução aquosa fria de HCl a 2% em massa para a remoção de compostos minerais como carbonato de cálcio. Em seguida, é realizada a hidrólise alcalina a quente em solução aquosa de NaOH 5% em massa para a remoção de proteínas. Após essa etapa, obtém-se a quitina com um grau de acetilação superior a 50%¹¹¹. Para a obtenção da quitosana, a quitina é desacetilada com solução de NaOH a 50% em massa a 60 °C¹. O grau de desacetilação da quitosana é controlado por essa etapa, e a total desacetilação pode ser atingida por meio do emprego da hidrólise alcalina em etapas consecutivas.

Na etapa de desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil da quitina é rompida com formação de unidades de D-glucosamina, que contém um grupo amino livre. Entretanto, a quitosana não é uma macromolécula quimicamente uniforme, apresentando diferentes graus de desacetilação. Acima de 30% de desacetilação, o material já pode ser considerado quitosana, sendo que as aplicações e características dessa macromolécula dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e tamanho da cadeia polimérica¹¹². Esse biopolímero tem três tipos de grupos reativos funcionais: um grupo amino na posição C-2 e duas hidroxilas, uma primária e outra secundária, nas posições C-3 e C-6, respectivamente¹¹². É solúvel em diversos ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos¹¹³.

A maioria das indústrias que produzem quitina e quitosana em escala comercial está localizada no Japão, onde mais de 100 bilhões de toneladas de quitosana são manufaturadas por ano, a partir de carapaças de caranguejo e camarão¹¹⁴. Nessas indústrias, a quitosana é produzida a partir da quitina via processo termoquímico por hidrólise alcalina que promove a desacetilação da quitina, normalmente com NaOH (40% a 50% em massa) a 110 °C a 115 °C. Entretanto, os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e, conseqüentemente, as características da quitosana obtida são a temperatura e tempo de reação e concentração da solução de álcali,

razão quitina/álcali, tamanho das partículas da quitina e presença de agentes que evitem a despolimerização.

Para produzir 1 Kg de quitosana 70% desacetilada a partir de carapaças de caranguejo, são necessários 6,3 Kg de HCl, 1,8 Kg de NaOH, 0,5 t de água para o processo e 0,9 t de água de resfriamento¹¹³.

São diversas as aplicações da quitosana. Entretanto, verifica-se uma centralização para uso na purificação de água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos¹. A quitosana atua como flocculante e coagulante nos processos de tratamento de efluentes industriais e também pode ser utilizada na remoção de petróleo proveniente de derramamentos no mar, contribuindo para a solução de um dos grandes problemas ambientais mundiais¹¹³. No tratamento de efluentes industriais com elevados teores de metais pesados, a quitosana age como agente quelante na remoção de tais metais e resíduos, devido à presença de diferentes grupos funcionais, que podem ser usados para aumentar a eficiência de remoção de íons metálicos. O grupo funcional NH_2 da quitosana é de grande interesse devido à habilidade de formar ligações coordenadas covalentes com íons metálicos. Trabalhos têm sido realizados quanto à remoção de metais pesados, como cobre, chumbo, cádmio e mercúrio¹¹².

Também têm sido utilizados para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação controlada de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos^{1,113}.

Na indústria química, a quitosana é largamente utilizada para aplicações em cosméticos em função de sua natureza fungicida¹¹³; na produção de filmes fotográficos, por sua resistência à abrasão, características ópticas e facilidade de obtenção de filmes¹; na indústria papelreira, aumentando a resistência mecânica e a impermeabilidade do papel; e também na curtição e acabamento de artefatos de couros¹¹³.

A aplicação da quitosana como suporte para a imobilização de enzimas se deve às suas diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras e outras. Os biopolímeros quitina e quitosana são comercializados pela empresa Sigma-Aldrich nas formas em pó e escamas. Na forma de hidrogel (Chitopearl), é comercializada pela empresa japonesa¹¹³ Fuji Spinning Co. Ltda. A literatura relata também diferentes tipos de preparação de quitosana, nas formas de membranas, cápsulas, fibras e esponjas sintetizadas por diferentes procedimentos, alterando as propriedades físicas do polissacarídeo para aumentar a sua estabilidade e durabilidade¹¹³. Essa estratégia permite obter um suporte apropriado para os

diferentes procedimentos de imobilização. Outra propriedade importante é a presença de diferentes grupos funcionais, grupos hidroxila e amino, que permitem a utilização de diferentes métodos de imobilização¹¹⁵. Possui baixa estabilidade em pH ácido, e diversas alternativas são propostas para remediar essa condição, como reticulação com agentes bifuncionais para a formação de géis mais resistentes ou a aplicação de outros biopolímeros como carragenina, gelatina e alginato. Essas técnicas têm sido utilizadas para diversas aplicações, como liberação controlada de fármacos e suporte para a imobilização de enzimas^{101,110}.

Resina de afinidade Toyopearl

A empresa Tosoh Bioscience com sede no Japão e com filiais na Alemanha e Estados Unidos comercializam resinas acrílicas de afinidade chamadas Toyopearl, com diferentes propriedades para processos de separação e purificação de compostos orgânicos, normalmente proteínas*. Essas resinas apresentam diferentes grupos químicos em sua estrutura, com o objetivo de se ligarem em diferentes grupos reativos. São hidrofílicas, com alta porosidade para poderem acomodar proteínas de alta massa molecular, aproximadamente 1.000 Å de diâmetro de poros, e diâmetros de partículas da ordem de 40 µm a 90 µm, com aplicações em escalas laboratorial e industrial. Podem ser empregadas na síntese de peptídeos e oligonucleotídeos devido à sua excelente estabilidade em diferentes solventes orgânicos e em condições extremas de pH. De acordo com o catálogo informativo fornecido pela Tosoh Bioscience, essas resinas estão divididas em três classes: resinas ativadas que não necessitam de reagentes químicos para a estabilização do complexo resina/proteína; resinas específicas que possuem mecanismos de ligação distintos (quelação e adsorção) e resinas reativas que necessitam desses agentes para a estabilização do complexo.

Resinas ativadas Toyopearl AF-Tresil-650M e Toyopearl AF-Epóxi-650M são de grande importância biotecnológica e possuem em sua estrutura cerca de 20 µmoles de grupos tresil e ≥ 100 µmoles de grupos epóxi.mL⁻¹ de resina úmida. Essas resinas sofrem ataque nucleofílico de grupos amino e tiol de proteínas ideais na imobilização de proteínas, carboidratos e glicoproteínas. Resinas específicas Toyopearl AF-Quelato-650M, Toyopearl AF-Blue HC-650M e Toyopearl AF-Red-650M são bastante empregadas

* Ver www.tosohbioscience.com.

na purificação de polimerases, ciclases, transferases e albumina. Já as resinas reativas são representadas por Toyopearl AF-Carbóxi-650M, Toyopearl AF-Formil-650M e Toyopearl AF-Amino-650M. Essas resinas possuem alta densidade de grupos reativos em sua estrutura e também são empregadas em processos de purificação e separação de diferentes proteínas, conforme exibe a Tabela 15.1. Ligam-se covalentemente aos grupos reativos da enzima e requerem agentes químicos para estabilizar as ligações. AF-Formil-650M e AF-Amino-650M necessitam de cianoborohidreto de sódio a fim de reduzir as bases de Schiff (ligações iminas) após reação covalente com a proteína para a obtenção de um derivado inerte. Já AF-Amino-650M e AF-Carbóxi-650M necessitam de carbodi-imida.

Tabela 15.1 Concentração de proteína imobilizada em diferentes resinas acrílicas comercializadas pela empresa Tosoh Bioscience

| PI (MG.ML ⁻¹ DE GEL) | AF-TRESIL-650M | AF-FORMIL-650M | AF-AMINO-650M | AF-CARBÓXI-650M |
|---------------------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|
| Inibidor de tripsina de soja | 16,0 | 3,50 | 5,80 | 15,0 |
| Concanavalina A | 13,0 | — | — | — |
| α -Quimotripsina | 12,5 | — | — | — |
| Mioglobina | 12,4 | — | — | — |
| Ovalbumina | — | 2,50 | 6,70 | 0,80 |
| Albumina de soro bovina | 12,4 | 14,0 | 19,2 | 3,30 |
| Imunoglobulina humana | 10,0 | 15,0 | 6,70 | 11,7 |
| Lisozima | 60,0 | 20,0 | 5,80 | 17,5 |

Legenda: PI, proteína imobilizada (mg.mL⁻¹ de gel).

Fonte: www.tosohbioscience.com

A resina AF-Amino-650M possui cerca de 90 μ moles de grupos amino x mL⁻¹ de resina úmida e diâmetro de partícula e poro de 6.500 Å e 1.000 Å, respectivamente, e estabilidade em uma ampla faixa de pH (de 2 a 13), condições ideais em processos de imobilização de enzimas*. Esse suporte apresenta também grupos hidroxilas que podem ser importantes no processo de imobilização, como mostra a Figura 15.6.

Diferentes agentes de ativação, como glicidol e epícloridrina, reagem preferencialmente com os grupos hidroxila, produzindo géis glioxil, e os

* Ver www.separations.us.tosohbioscience.com.

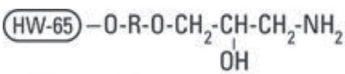


Figura 15.6 Estrutura química da resina acrílica Toyopearl AF-Amino-650M.

grupos amino podem reagir com glutaraldeído, um agente bifuncional bastante empregado em técnicas de imobilização, o que torna interessante o uso dessa resina como matriz de imobilização de enzimas⁴⁵.

Nanomaterias

Os nanomateriais, como as nanopartículas, nanotubos, nanofibras, nanoporos, nanofolhas e nanocompósitos têm encontrado muitas aplicações em biotecnologia industrial. A Tabela 15.2 apresenta os diversos tipos de suportes nanoestruturados que têm sido empregadas para a imobilização de enzimas. As vantagens de enzimas imobilizadas em partículas de dimensão micrométricas são adquiridas quando os nanomateriais são usados como suportes sólidos para a imobilização das mesmas enzimas¹¹⁶⁻¹¹⁸. Surgem novos fenômenos, geralmente favoráveis quando o tamanho do carreador se aproxima de dimensões nanométricas. Os seguintes fatores, apresentados no contexto de nanomateriais, são considerações importantes na avaliação da adequação de um material para a imobilização da enzima.

- a) *Razão entre superfície e volume*: nanomateriais têm grande razão área superficial e volume. Nanofibras oferecem dois terços de sua relação superfície/volume de (aproxidamente) partículas esféricas de mesmo diâmetro^{117,119}.

Tabela 15.2 Lista de materiais nanoestruturados utilizados para a imobilização de enzimas

| NANOMATERIAL(IS) USADO(S) | TIPO DE NANOSUORTE | REFERÊNCIAS |
|---------------------------|--|-------------|
| Nanopartículas | Nanopartículas de óxido de ferro (Fe ₂ O ₃ e Fe ₃ O ₄), poliestireno, sílica, zircônia, quitosana, ácido polilático, ZnO, POS-PVA | 120-126 |
| Nanofibras | Nanofibras poli (estireno-co-maleico anidrido), poli-(acrilonitrila-co-ácidomaleico), polivinil álcool; nanofibras de celulose, nanofibras de polissulfona, fibra de seda policaprolactona | 127-132 |

| NANOMATERIAL(IS) USADO(S) | TIPO DE NANOSUORTE | REFERÊNCIAS |
|------------------------------|--|-------------|
| Nanotubos | Os nanotubos de carbono (de parede simples ou múltipla), Peptídeos | 133, 134 |
| Nanoporos | Matéria mobil cristalina-41 (MCM-41; tamanho dos poros: 4 nm); Santa Barbara amorphous-15 (SBA-15; pré-tamanho: 5-13 nm), espuma mesocelular (MCF, tamanho dos poros 15-40 nm), folhas dobradas sílicas mesoporosas, FSM4 (4 nm) e FSM7 (7 nm) | 135-139 |
| Nanofolhas | Óxido de grafeno | 140 |
| Nanocompósitos | Nanopartículas de sílica revestidas; nanopartículas de ouro revestidas; óxido de titânio e silício; partículas magnéticas revestidas com quitosana, nanopartículas revestidas com celulose | 141-143 |

- b) *Carregamento da enzima*: materiais em escala nanométrica oferecem alta carga de enzima, devido à sua grande área superficial relativa. Alto carregamento de enzimas leva a uma melhor atividade biocatalítica e estabilidade. Isso faz com que o nanosupor te seja um suporte ideal para a imobilização de enzima em relação aos materiais convencionais.
- c) *Taxa de fluxo*: o nanomaterial imobilizado se comporta como uma partícula estável, monodispersa em suspensão aquosa e exibindo o movimento browniano¹¹⁹. De acordo com a equação de Stokes-Einstein, a mobilidade e difusibilidade de nanopartículas têm que ser menores do que as das enzimas livres, com base em seus tamanhos relativamente grandes. Essa diferença de mobilidade pode apontar para uma região de transição entre a catálise homogênea com enzimas livres e a catálise heterogênea com enzimas imobilizadas. Tem sido demonstrado que o movimento browniano pode ser responsável por atividades elevadas obtidas quando as enzimas são imobilizadas em nanopartículas¹⁴⁴.
- d) *Transferência de massa*: a atividade enzimática aparente poderia ser melhorada devido à aliviada limitação de transferência de massa de substrato sem nanoestruturas, quando comparada com as matrizes em escala macro na imobilização convencional de enzimas. As enzimas imobilizadas em nanomateriais têm baixa resistência à transferência de massa e, portanto, têm uma elevada atividade e estabilidade¹¹⁶.
- e) *Facilidade de separação*: nanomateriais magnéticos facilitam grandemente a separação, permitindo a utilização de um ímã para remover rápida e eficientemente a enzima imobilizada do produto¹⁴⁵. Isto permite uma maior capacidade de reutilização e preservação da estabilidade da enzima ligada em comparação com os sistemas de matrizes convencionais, nos quais a centrifugação/filtração é a única opção para separar a enzima

a partir do produto. Tais operações podem levar à lixiviação/instabilidade da enzima devido à mecânica de cisalhamento, enquanto se mistura o *pellet* com o tampão apropriado ao começar uma nova reação¹⁴⁶. Por conseguinte, mostrou-se que os baixos custos dos processos de nanopartículas magnéticas fazem deles uma opção interessante e econômica.

- f) *O projeto do reator*: relatou-se na literatura que um número de reatores enzimáticos melhoram o desempenho da eficiência da enzima¹⁴⁷. A imobilização de enzimas é fundamental para o desenvolvimento de reatores, biossensores ou sistemas de análise total ou micro¹³². Os nanomateriais, especialmente as nanofibras, oferecem maior flexibilidade na concepção do reator, pois são mais fáceis de serem preparadas e manuseadas¹²⁸. A pequena perda de pressão e a alta taxa de fluxo das membranas de nanofibras representam as vantagens mais importantes dos biorreatores de membrana de nanofibras com enzima imobilizada sobre os biorreatores tradicionais de membrana com enzima imobilizada e biorreatores de leito fixo. Um biorreator de membrana fibrosa com enzima imobilizada foi estabelecido com uma conversão de hidrólise contínua constante a uma velocidade constante e taxa de fluxo sob condições ideais¹⁴⁸.

15.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

As enzimas são capazes de catalisar reações de hidrólise, transesterificação, isomerização, oxirredução esterificação, transferência de grupos inter e intramoleculares, adição de grupos em ligações duplas, dentre outras. Ou seja, são capazes de catalisar qualquer tipo de reação orgânica atuando de maneira específica e em condições reacionais brandas. Desde 1960, quando a tecnologia enzimática surgiu como área de investigação, as enzimas imobilizadas têm sido testadas para a produção de produtos de interesse em ramos industriais diversificados. A Tabela 15.3 sumariza exemplos de enzimas imobilizadas por diferentes técnicas sendo testadas na obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

Tabela 15.3 Métodos de imobilização de enzimas, tipos de suportes e aplicações dos sistemas imobilizados na obtenção de produtos de interesse industrial

| ENZIMA | SUORTE | MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO | APLICAÇÕES | REFERÊNCIA |
|--------------------------|---|---|--|------------|
| α -Amilase | Nanopartículas de sílica | Adsorção | Formulações de sabão em pó | 149 |
| α -Quimiotripsina | Nanopartículas magnéticas de quitosana | Ligação covalente | Síntese de peptídeos | 150 |
| α -Galactosidase | Grafeno funcionalizado | Ligação covalente | Hidrólise de oligossacarídeos | 151 |
| β -Galactosidase | Partículas de quitosana e agarose | Ligação covalente | Hidrólise da lactose | 152 |
| β -Glicosidase | Partículas de quitosana | Ligação covalente | Hidrólise da isoflavona | 153 |
| Álcool oxidase | Nanofibras de poliestireno-co-anidrido maleico (PSMA) | Ligação covalente e adsorção seguida de reticulação | Determinação de álcool em saliva | 154 |
| Fosfatase alcalina | Lâminas de vidro recobertas por filmes de sílica | Adsorção | Desenvolvimento de superfícies bioativas para aplicações médicas | 155 |
| Catalase | Nanotubos de titanatos | Ligação covalente | Biossensores | 156 |
| Glicoamilase | Nanotubos de carbono de paredes múltiplas | Ligação covalente | Biossensor para detecção de amido | 157 |
| Invertase | poliuretano | Ligação covalente | Síntese de açúcar invertido | 158 |
| Lacase | Nanopartículas de titânia e membranas de titânia funcionalizada | Adsorção, Ligação covalente e adsorção seguida de reticulação | Remoção de compostos recalcitrantes em águas residuais | 159 |
| Lactatodesidrogenase | Nanopartículas magnéticas revestidas com sílica | Ligação covalente | Produção de compostos quirais | 160 |
| Lipase | Partículas de poli-hidroxibutirato | Adsorção | Síntese de aroma | 161 |
| Tripsina | Nanopartículas magnéticas decarboximetilquitosana | Adsorção | Digestão de proteínas | 162 |
| Urease | Partículas de quitosana | Ligação covalente | Biossensor para determinação do conteúdo de ureia | 163 |

15.7 CONCLUSÃO

Para que a substituição de processos químicos convencionais por tecnologia enzimática continue a se expandir é de fundamental importância a continuidade de esforços científicos que proponham alternativas de redução de custo do processo, principalmente das enzimas. Os principais desafios referem-se à produção de biocatalisadores robustos e economicamente viáveis. Nesse sentido, a imobilização de enzimas abre possibilidades para a obtenção de biocatalisadores com propriedades catalíticas e operacionais adequadas para uma infinidade de aplicações industriais. Além disso, a principal vantagem da utilização de enzimas imobilizadas é a possibilidade de reutilização, o que torna a tecnologia enzimática menos onerosa e, portanto, mais competitiva. Ao longo dos anos, várias técnicas e suportes têm sido investigados; conseqüentemente, preparações enzimáticas com ampla faixa de eficiência, estabilidade e atividade estão disponíveis em escala laboratorial. Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos, não há um método aplicável a todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada em biocatálise é necessário escolher o procedimento mais simples, mais barato e mais sustentável, que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

15.8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para ampliar a utilização em larga escala de enzimas imobilizadas é necessária a resolução de desafios tecnológicos, incluindo a constante busca por novos suportes e protocolos de imobilização que mantenham a atividade catalítica da enzima após o processo de imobilização, suprimam interações deletérias entre as enzimas, ofereçam uma transferência de massa facilitada, apresentem baixo custo de aquisição e potencial para aplicações comerciais diretas. Uma boa compreensão da química dos nanomateriais, realizando a funcionalização, e da natureza das enzimas selecionadas, combinada com a seleção adequada da técnica de imobilização, podem levar ao desenvolvimento de novos sistemas nanobiocatalíticos robustos.

A inativação de enzimas por solventes durante a produção de biodiesel, por exemplo, pode ser evitada através da procura de uma solução robusta, lipase estável/tolerante ao solvente. Isso será possível por meio de engenharia de proteínas, tais como mutagênese iterativa saturada (*iterative saturated mutagenesis* – ISM) ou outras abordagens de biologia molecular, que podem

produzir novos e robustos biocatalisadores recombinantes com maior eficiência e estabilidade biocatalítica com potencial para múltiplas reutilizações. ISM tem provado ser muito mais eficiente do que todos os esforços sistemáticos anteriores utilizando reação em cadeia da polimerase propensa a erros em diferentes taxas de mutação, mutagênese de saturação em pontos quentes e/ou embaralhamento do DNA (*DNA shuffling*). Efeitos epistáticos positivos pronunciados foram encontrados e podem ser a principal razão para isso¹⁶⁴.

A combinação interdisciplinar de biotecnologia e nanotecnologia representa uma oportunidade promissora, abrindo a porta para um aumento da quantidade e da eficiência de produção de produtos potencialmente comerciais. O uso repetido de sistemas nanobiocatalíticos estáveis e eficientes poderia melhorar significativamente a viabilidade econômica desses produtos no futuro.

REFERÊNCIAS

1. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol.* 2004;35(2-3):126-39.
2. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):235-51.
3. BCC Research. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications 2012 [Internet]. [Cited 2013 May 4]. Available from: <http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>.
4. Fernández-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb Technol.* 2007;41(5):565-9.
5. Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev.* 2009;38(2):453-68.
6. Langlois DP, Dale JK. Sirup and method of making the same. 1940; United States patent US 2201609, 1940.
7. Marconi W. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. *Reac Polym.* 1989;11(0):1-19.
8. Grubhofer N, Schleith L. Modifizierte Ionenaustauscher als spezifische Adsorbentien. *Naturwissenschaften.* 1953;40(19):508.
9. Manecke G. Immobilization of enzymes by various synthetic polymers. *Biotechnol Bioeng Symp.* 1972;3:185-7.
10. Takasaki Y, Kosugi Y, Kanbayashi A. *Fermentation Advances*. Perlman D, editor. New York: Academic Press; 1969.
11. Chibata I, Tosa T. Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. In: Wingard LB, Katchalski-Katzir E, Goldsmith L, editors. *Appl Biochemistry Bioengineering*. 1. ed. London: Academic Press; 1976. p. 239-360.
12. Doscher MS, Richards FM. The Activity of an Enzyme in the Crystalline State: Ribonuclease S. *J Biol Chem.* 1963;238:2399-406.
13. St. Clair NL, Navia MA. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J Am Chem Soc.* 1992;114:7314-16.
14. Margolin AL. Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol.* 1996;14(7):223-30.
15. Lalonde JJ. Application of cross-linked enzyme crystals as elective catalysts for synthesis. *Curr Opin Drug Discovery Dev.* 1998;1:272-7.
16. Haring D, Schreier P. Cross-linked enzyme crystals. *Curr Opin Chem Biol.* 1999;13:35-8.
17. Margolin AL, Navia MA. Protein Crystals as Novel Catalytic Materials. *Angew Chem Int Ed.* 2001;40(12):2204-22.

18. Sheldon RA, Schoevaart R, Van Langen LM. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal Biotransform.* 2005;23(3-4):141-7.
19. Straathof AJJ, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(6):548-56.
20. Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett.* 2009;31(11):1639-50.
21. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(6):1451-63.
22. Mendes AA, Oliveira PCd, Castro HFd, Giordano RLC. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova.* 2011;34(5):831-40.
23. Dalla-Vecchia R, Nascimento MdG, Soldi V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova.* 2004;27(4):623-30.
24. Illanes A, Cauherff A, Wilson L, Castro GR. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour Technol.* 2012;115(0):48-57.
25. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv.* 2013 Dec;31(8):1808-25.
26. Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv Synth Catal.* 2011;353(16):2885-904.
27. Zhou Z, Inayat A, Schwieger W, Hartmann M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. *Microporous Mesoporous Mat.* 2012;154(1):133-41.
28. Zheng M-M, Lu Y, Dong L, Guo P-M, Deng Q-C, Li W-L, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Bioresour Technol.* 2012;115(1):141-6.
29. Secundo F, Miehe-Brendlé J, Chelaru C, Ferrandi EE, Dumitriu E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous Mesoporous Mat.* 2008;109(1-3):350-61.
30. Arica MY, Altintas B, Bayramoğlu G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):665-9.
31. Guidini CZ, Fischer J, Santana LNS, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochem Eng J.* 2010;52(2-3):137-43.
32. Reis P, Witula T, Holmberg K. Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme. *Microporous Mesoporous Mat.* 2008;110(2-3):355-62.

33. He J, Song Z, Ma H, Yang L, Guo C. Formation of a mesoporous bioreactor based on SBA-15 and porcine pancreatic lipase by chemical modification following the uptake of enzymes. *J Mater Chem.* 2006;16(44):4307-15.
34. Serra E, Mayoral Á, Sakamoto Y, Blanco RM, Díaz I. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. *Microporous Mesoporous Mat.* 2008;114(1-3):201-13.
35. Fernandez-Lorente G, Cabrera Z, Godoy C, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem.* 2008;43(10):1061-7.
36. Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature.* 1990;343(6260):767-70.
37. Derewenda U, Brzozowski AM, Lawson DM, Derewenda ZS. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry.* 1992;31(5):1532-41.
38. Palomo JM, Muñoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B: Enzym.* 2002;19-20(1):279-86.
39. Marciello M, Bolivar JM, Filice M, Mateo C, Guisan JM. Preparation of Lipase-coated, stabilized, hydrophobic magnetic particles for reversible conjugation of biomacromolecules. *Biomacromolecules.* 2013;14(3):602-7.
40. Macario A, Moliner M, Corma A, Giordano G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. *Microporous Mesoporous Mat.* 2009;118(1-3):334-40.
41. Miletić N, Vuković Z, Nastasović A, Loos K. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. *J Mol Catal B: Enzym.* 2009;56(4):196-201.
42. Pedroche J, del Mar Yust M, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M, et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(5):1160-6.
43. Manrich A, Galvão CMA, Jesus CDE, Giordano RC, Giordano RLC. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. *Int J Biol Macromol.* 2008;43(1):54-61.
44. Rodrigues DS, Mendes AA, Adriano WS, Gonçalves LRB, Giordano RLC. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J Mol Catal B: Enzym.* 2008;51(3-4):100-9.

45. Mendes AA, Giordano RC, Giordano RdLC, de Castro HF. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *J Mol Catal B: Enzym.* 2011;68(1):109-15.
46. Chaubey A, Parshad R, Taneja SC, Qazi GN. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. *Process Biochem.* 2009;44(2):154-60.
47. Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochem.* 2012;47(8):1220-7.
48. Guisán J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb Technol.* 1988;10(6):375-82.
49. Erdemir S, Yilmaz M. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. *J Mol Catal B: Enzym.* 2009;58(1-4):29-35.
50. Cowan DA, Fernandez-Lafuente R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme Microb Technol.* 2011;49(4):326-46.
51. Mendes AS, de Castro HF, Rodrigues DS, Adriano WS, Tardioli PW, Mammarella EJ, et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011;38(8):1055-66.
52. Quiocho FA, Richards FM. The enzymic behavior of Carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochemistry.* 1966;5(12):4062-76.
53. Sigler PB, Skinner HCW. The reaction of diisopropylfluorophosphate with crystals of γ -chymotrypsin. *Biochem Bioph Res Commun.* 1963;13(3):236-40.
54. Quiocho FA, Richards FM. Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase-A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1964;52:833-9.
55. Roy JJ, Abraham TE. Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. *J Mol Catal B: Enzym.* 2006;38(1):31-6.
56. Abraham TE, Joseph JR, Bindhu LBV, Jayakumar KK. Crosslinked enzyme crystals of glucoamylase as a potent catalyst for biotransformations. *Carbohydr Res.* 2004;339(6):1099-104.
57. Amotz S, Novo Industri A/S. Method for production of an immobilized enzyme preparation by means of a crosslinking agent. US4665028; 1987.
58. Cruz J, Barbosa O, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R, Torres R, Ortiz C. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. *J Mol Catal B: Enzym.* 2012;80(1):7-14.

59. Gupta P, Dutt K, Misra S, Raghuwanshi S, Saxena RK. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Bioresour Technol.* 2009;100(18):4074-6.
60. Cao L, Langen Lv, Sheldon RA. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(4):387-94.
61. La Rotta Hernandez CE, Lütz S, Liese A, Bon EPS. Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking. *Enzyme Microb Technol.* 2005;37(6):582-8.
62. Han K-K, Richard C, Delacourte A. Chemical cross-links of proteins by using bifunctional reagents. *Int J Biochem.* 1984;16(2):129-45.
63. Wong SS, Wong L-JC. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb Technol.* 1992;14(11):866-74.
64. Yu HW, Chen H, Wang X, Yang YY, Ching CB. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. *J Mol Catal B: Enzym.* 2006;43(1-4):124-7.
65. Sheldon RA. Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* 2007;349(8-9):1289-307.
66. Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnology.* 2007;25(2):66-73.
67. Persichetti RA, Clair NLS, Griffith JP, Navia MA, Margolin AL. Cross-linked enzyme rystals (CLECs) of thermolysin in the synthesis of peptides. *J Am Chem Soc.* 1995;117(10):2732-7.
68. Kim W, Chae H, Park C, Lee K. Stability and activity of cross-linking enzyme crystals of cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus macerans*. *J Mol Catal B: Enzym.* 2003;26(3-6):287-92.
69. Gogoi S, Hazarika S, Rao PG, Dutta NN. Esterification of lauric acid with lauryl alcohol using cross-linked enzyme crystals: Solvent effect and kinetic study. *Biocatal Biotransform.* 2006;24(5):343-51.
70. Roy JJ, Abraham TE, Abhijith KS, Kumar PVS, Thakur MS. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosens Bioelectron.* 2005;21(1):206-11.
71. Jegan Roy J, Emilia Abraham T. Strategies in making Cross-Linked Enzyme Crystals. *Chem Rev.* 2004;104(9):3705-22.
72. Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org Lett.* 2000;2(10):1361-4.
73. Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb Technol.* 2009;45(6-7):405-18.

74. Wilson L, Illanes A, Abián O, Pessela BCC, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Co-Aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: An easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. *Biomacromolecules*. 2004;5(3):852-7.
75. López-Gallego F, Betancor L, Hidalgo A, Alonso N, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. *Biomacromolecules*. 2005;6(4):1839-42.
76. Wilson L, Fernández-Lorente G, Fernández-Lafuente R, Illanes A, Guisán JM, Palomo JM. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme Microb Technol*. 2006;39(4):750-5.
77. Andersson MM, Hatti-Kaul R. Protein stabilising effect of polyethyleneimine. *J Biotechnol*. 1999;72(1-2):21-31.
78. Wilson L, Betancor L, Fernández-Lorente G, Fuentes M, Hidalgo A, Guisán JM, et al. Cross-linked egggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure. *Biomacromolecules*. 2004;5(3):814-7.
79. Wang M, Jia C, Qi W, Yu Q, Peng X, Su R, et al. Porous-CLEAs of papain: Application to enzymatic hydrolysis of macromolecules. *Bioresour Technol*. 2011;102(3):3541-5.
80. Vaidya BK, Kuwar SS, Golegaonkar SB, Nene SN. Preparation of cross-linked enzyme aggregates of l-aminoacylase via co-aggregation with polyethyleneimine. *J Mol Catal B: Enzym*. 2012;74(3-4):184-91.
81. Shah S, Sharma A, Gupta MN. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Anal Biochem*. 2006;351(2):207-13.
82. López-Serrano P, Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol Lett*. 2002;24(16):1379-83.
83. Brem J, Turcu MC, Paizs C, Lundell K, Toşa M-I, Irimie F-D, et al. Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters. *Process Biochem*. 2012;47(1):119-26.
84. Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom APG, van Rantwijk F, et al. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng*. 2004;87(6):754-62.
85. Matijošytė I, Arends IWCE, de Vries S, Sheldon RA. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *J Mol Catal B: Enzym*. 2010;62(2):142-148.
86. Dalal S, Kapoor M, Gupta MN. Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *J Mol Catal B: Enzym*. 2007;44(3-4):128-32.
87. Kato M, Sakai-Kato K, Matsumoto N, Toyo'oka T. A protein-encapsulation technique by the sol-gel method for the preparation of monolithic columns for capillary electrochromatography. *Anal Chem*. 2002;74(8):1915-21.

88. Hage D, Ruhn P. An introduction to affinity chromatography. In: Hage DS, editor. Handbook of affinity chromatography. Chromatographic Science Series. Second Edition ed. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 3-13.
89. Hodgson RJ, Chen Y, Zhang Z, Tleugabulova D, Long H, Zhao X, et al. Protein-doped monolithic silica columns for capillary liquid chromatography prepared by the sol-gel method: Applications to frontal affinity chromatography. Anal Chem. 2004;76(10):2780-90.
90. Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. J Mol Catal B: Enzym. 2000;9(4-6):113-48.
91. Alfaya AAS, Kubota LT. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. Química Nova. 2002;25:835-41.
92. Talbert JN, Goddard JM. Enzymes on material surfaces. Colloids Surf B. 2012;93(1):8-19.
93. Wang Y, Hsieh YL. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. J Membrane Sci. 2008;309(1-2):73-81.
94. Huang X-J, Chen P-C, Huang F, Ou Y, Chen M-R, Xu Z-K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. J Mol Catal B: Enzym. 2011;70(3-4):95-100.
95. Liu C-X, Zhang S-P, Su Z-G, Wang P. LiCl-induced improvement of multilayer nanofibrous lipase for biodiesel synthesis. Bioresour Technol. 2012;103(1):266-72.
96. Dalla-Vecchia R, Nascimento MD, Soldi V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. Química Nova. 2004;27(4):623-30.
97. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. Enzyme Microb Technol. 2000 ;26(7):509-15.
98. Palomo JM, Munoz G, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. J Mol Catal B:Enzym. 2002;19:279-86.
99. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lorente G, Pedroche J, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. Biotechnol Progress. 2002;18(3):629-34.
100. Lopez-Gallego F, Montes T, Fuentes M, Alonso N, Grazu V, Betancor L, et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. J Biotechnol. 2005;116(1):1-10.
101. Adriano WS, Mendonca DB, Rodrigues DS, Mammarella EJ, Giordano RLC. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. Biomacromolecules. 2008;9(8):2170-9.

102. Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, Lopez-Gallego F, et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):274-80.
103. Adkins NL, Johnson CN, Georgel PT. Characterization of chromatin samples in the presence of *Drosophila* embryo extract by quantitative agarose gel electrophoresis. *J Biochem Bioph Meth.* 2006;67(2-3):141-50.
104. Fernandez-Lafuente R, Cowan DA, Wood ANP. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Technol.* 1995;17(4):366-72.
105. Palomo JM, Ortiz C, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. *J Chromatogr A.* 2004;1038(1-2):267-73.
106. Rodrigues DS, Mendes AA, Adriano WS, Goncalves LRB, Giordano RLC. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J Mol Catal B:Enzym.* 2008;51(3-4):100-9.
107. Fernandez-Lorente G, Godoy CA, Mendes AA, Lopez-Gallego F, Grazu V, de las Rivas B, et al. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. *Biomacromolecules.* 2008;9(9):2553-61.
108. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – A review. *J Control Release.* 2006;114(1):1-14.
109. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol.* 2004;35(2-3):126-39.
110. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;57(1):19-34.
111. Gupta KC, Jabrail FH. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydr Polym.* 2006;66(1):43-54.
112. Li N, Bai RB. A novel amine-shielded surface cross-linking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. *Ind Eng Chem Res.* 2005;44(17):6692-700.
113. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46(1):1-27.
114. Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V. Chitin deacetylases: New, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2000;18(7):305-12.
115. Chiou S-H, Wu W-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials.* 2004;25(2):197-204.
116. Kim J, Grate JW, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci.* 2006;61(3):1017-26.

117. Gupta MN, Kaloti M, Kapoor M, Solanki K. Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. *Artif Cell Blood Sub.* 2011;39(2):98-109.
118. Ansari SA, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol Adv.* 2012;30(3):512-23.
119. Wang P. Nanoscale biocatalyst systems. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(6):574-9.
120. Dyal A, Loos K, Noto M, Chang SW, Spagnoli C, Shafi KVPM, et al. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on gamma-Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003;125(7):1684-5.
121. Tang ZX, Qian JQ, Shi LE. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. *Mater Lett.* 2007;61(1):37-40.
122. Wang X, Dou PP, Zhao P, Zhao CM, Ding Y, Xu P. Immobilization of Lipases onto Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles for application in biodiesel production. *Chemsuschem.* 2009;2(10):947-50.
123. Chen YZ, Ching CB, Xu R. Lipase immobilization on modified zirconia nanoparticles: Studies on the effects of modifiers. *Process Biochem.* 2009 ;44(11):1245-51.
124. Andrade LH, Rebelo LP, Netto CGCM, Toma HE. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *J Mol Catal B:Enzym.* 2010;66(1-2):55-62.
125. Wu Y, Wang YJ, Luo GS, Dai YY. Effect of solvents and precipitant on the properties of chitosan nanoparticles in a water-in-oil microemulsion and its lipase immobilization performance. *Bioresour Technol.* 2010 Feb;101(3):841-4.
126. Chronopoulou L, Kamel G, Sparago C, Bordi F, Lupi S, Diociaiuti M, et al. Structure-activity relationships of *Candida rugosa* lipase immobilized on polylactic acid nanoparticles. *Soft Matter.* 2011;7(6):2653-62.
127. Ye P, Xu ZK, Wu J, Innocent C, Seta P. Nanofibrous membranes containing reactive groups: Electrospinning from poly(acrylonitrile-co-maleic acid) for lipase immobilization. *Macromolecules.* 2006;39(3):1041-5.
128. Nair S, Kim J, Crawford B, Kim SH. Improving biocatalytic activity of enzyme-loaded nanofibers by dispersing entangled nanofiber structure. *Biomacromolecules.* 2007;8(4):1266-70.
129. Sinha S, Dhakate SR, Kumar P, Mathur RB, Tripathi P, Chand S. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for chitosanase immobilization and its application in selective production of chitooligosaccharides. *Bioresour Technol.* 2012;115:152-7.
130. Wang Y, Hsieh YL. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *J Membrane Sci.* 2008;309(1-2):73-81.
131. Huang XJ, Chen PC, Huang F, Ou Y, Chen MR, Xu ZK. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *J Mol Catal B:Enzym.* 2011;70(3-4):95-100.

132. Song J, Kahveci D, Chen ML, Guo Z, Xie EQ, Xu XB, et al. Enhanced catalytic activity of lipase encapsulated in PCL nanofibers. *Langmuir*. 2012;28(14):6157-62.
133. Yu LT, Banerjee IA, Gao XY, Nuraje N, Matsui H. Fabrication and application of enzyme-incorporated peptide nanotubes. *Bioconjugate Chem*. 2005;16(6):1484-7.
134. Shah S, Solanki K, Gupta MN. Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes. *Chem Cent J*. 2007 29;1.
135. Diaz JF, Balkus KJ. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *J Mol Catal B:Enzym*. 1996;2(2-3):115-26.
136. Kang Y, He J, Guo XD, Guo X, Song ZH. Influence of pore diameters on the immobilization of lipase in SBA-15. *Ind Eng Chem Res*. 2007;46(13):4474-9.
137. Serra E, Mayoral A, Sakamoto Y, Blanco RM, Diaz I. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. *Microporous Mesoporous Mat*. 2008;114(1-3):201-13.
138. Nikolic MP, Srdic VV, Antov MG. Immobilization of lipase into mesoporous silica particles by physical adsorption. *Biocatal Biotransform*. 2009;27(4):254-62.
139. Matsuura S, Ishii R, Itoh T, Hamakawa S, Tsunoda T, Hanaoka T, et al. Immobilization of enzyme-encapsulated nanoporous material in a microreactor and reaction analysis. *Chem Eng J*. 2011;167(2-3):744-9.
140. Zhang JL, Zhang F, Yang HJ, Huang XL, Liu H, Zhang JY, et al. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. *Langmuir*. 2010;26(9):6083-5.
141. Long JW, Logan MS, Rhodes CP, Carpenter EE, Stroud RM, Rolison DR. Nanocrystalline iron oxide aerogels as mesoporous magnetic architectures. *J Am Chem Soc*. 2004;126(51):16879-89.
142. Georgelin T, Maurice V, Malezieux B, Siaugue JM, Cabuil V. Design of multifunctionalized gamma-Fe₂O₃@SiO₂ core-shell nanoparticles for enzymes immobilization. *J Nanopart Res*. 2010;12(2):675-80.
143. Teng ZG, Su XD, Chen GT, Tian CC, Li H, Ai L, et al. Superparamagnetic high-magnetization composite microspheres with Fe₃O₄@SiO₂ core and highly crystallized mesoporous TiO₂ shell. *Colloid Surface A*. 2012;402:60-5.
144. Jia H, Zhu G, Vugrinovich B, Kataphinan W, Reneker DH, Wang P. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnol Progress*. 2002;18(5):1027-32.
145. Safarik I, Safarikova M. Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chem Papers*. 2009;63(5):497-505.
146. Yiu HHP, Keane MA. Enzyme-magnetic nanoparticle hybrids: new effective catalysts for the production of high value chemicals. *J Chem Technol Biotechnol*. 2012;87(5):583-94.

147. Sotowa KI, Takagi K, Sugiyama S. Fluid flow behavior and the rate of an enzyme reaction in deep microchannel reactor under high-throughput condition. *Chem Eng J*. 2008;135:S30-S6.
148. Huang XJ, Yu AG, Xu ZK. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. *Bioresour Technol*. 2008;99(13):5459-65.
149. Soleimani M, Khani A, Najafzadeh K. α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *J Mol Catal B: Enzym*. 2012;74(1-2):1-5.
150. Ju H-Y, Kuo C-H, Too J-R, Huang H-Y, Twu Y-K, Chang C-MJ, et al. Optimal covalent immobilization of α -chymotrypsin on Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles. *J Mol Catal B: Enzym*. 2012;78(1):9-15.
151. Singh N, Srivastava G, Talat M, Raghubanshi H, Srivastava ON, Kayastha AM. Cicer α -galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. *Food Chem*. 2014;142(1):430-8.
152. Vieira DC, Lima LN, Mendes AA, Adriano WS, Giordano RC, Giordano RLC, et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. *Biochem Eng J*. 2013;81(1):54-64.
153. Chang J, Lee Y-S, Fang S-J, Park D-J, Choi Y-L. Hydrolysis of isoflavone glycoside by immobilization of β -glucosidase on a chitosan-carbon in two-phase system. *Int J Biol Macromol*. 2013;61(1):465-70.
154. Zhao L, Liu Q, Yan S, Chen Z, Chen J, Li X. Multimeric immobilization of alcohol oxidase on electrospun fibers for valid tests of alcoholic saliva. *J Biotechnol*. 2013;168(1):46-54.
155. Ehlert N, Müller PP, Stieve M, Behrens P. Immobilization of alkaline phosphatase on modified silica coatings. *Microporous Mesoporous Mat*. 2010;131(1-3):51-7.
156. Ai Q, Yang D, Li Y, Shi J, Wang X, Jiang Z. Highly efficient covalent immobilization of catalase on titanate nanotubes. *Biochem Eng J*. 2014;83(1):8-15.
157. Lang Q, Yin L, Shi J, Li L, Xia L, Liu A. Co-immobilization of glucoamylase and glucose oxidase for electrochemical sequential enzyme electrode for starch biosensor and biofuel cell. *Biosens Bioelectron*. 2014;51(1):158-63.
158. Cadena PG, Jeronimo RAS, Melo JM, Silva RA, Lima Filho JL, Pimentel MCB. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresour Technol*. 2010;101(6):1595-602.
159. Hou J, Dong G, Ye Y, Chen V. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. *J Membrane Sci*. 2014;452(1):229-40.
160. Yusdy, Patel SR, Yap MGS, Wang DIC. Immobilization of l-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. *Biochem Eng J*. 2009;48(1):13-21.

161. Silva NCA, Miranda JS, Bolina ICA, Silva WC, Hirata DB, de Castro HF, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochem Eng J.* 2014;82(1):139-49.
162. Sun J, Hu K, Liu Y, Pan Y, Yang Y. Novel superparamagnetic nanoparticles for trypsin immobilization and the application for efficient proteolysis. *J Chromatogr B.* 2013;942-943(1):9-14.
163. Krishna BL, Singh AN, Patra S, Dubey VK. Purification, characterization and immobilization of urease from *Momordica charantia* seeds. *Process Biochem.* 2011;46(7):1486-91.
164. Reetz MT. Laboratory evolution of stereoselective enzymes: A prolific source of catalysts for asymmetric reactions. *Angew Chem Int Edit.* 2011;50(1):138-74.

16

CAPÍTULO

PRODUÇÃO DE ENZIMAS OXIDATIVAS EM SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS E APLICAÇÃO NA DESLIGNIFICAÇÃO DE POLPAS CELULÓSICAS

Amanda Monteiro Elias
Sergio Luis Moreira Neto
Walter de Carvalho
Adriane Maria Ferreira Milagres

16.1 INTRODUÇÃO

Diversos setores da produção industrial que incluem os sistemas de conversão de materiais lignocelulósicos demandam processos de transformação da matéria-prima que podem ser auxiliados pela ação de fungos específicos ou suas enzimas. Linhagens de micro-organismos que apresentam maior eficiência de produção de enzimas, aliadas a processos biotecnológicos, proporcionam parcerias em novos e interessantes negócios. Do ponto de vista

tecnológico, a biodegradação de materiais lignocelulósicos pode ser utilizada em diversos processos industriais de transformação destinados à produção de celulose e papel, biocombustíveis, além de outros. Nesses setores industriais, o foco está principalmente na utilização de enzimas, produto do metabolismo dos micro-organismos. Entretanto, as enzimas desenvolvidas até o momento precisam ganhar mais eficiência para que processos industriais mais produtivos sejam operacionalizados.

As principais enzimas relacionadas à degradação de materiais lignocelulósicos são as xilanases, celulasas, esterases, glucanases, celobiasas, peroxidases e lacases. A questão do efeito dessas enzimas na degradação do material lignocelulósico ainda não está totalmente definida. Apesar de nunca tanto esforço de pesquisa ter sido feito sobre essa temática, existe ainda uma enorme necessidade de que sejam desenvolvidas novas tecnologias competitivas, eficientes na conversão de biomassa em bioprodutos. O descobrimento das bases técnicas de obtenção e caracterização dessas enzimas tem gerado uma visão mais clara sobre o tema, e é o que pretendemos abordar neste capítulo.

O uso de enzimas para auxiliar na deslignificação de materiais lignocelulósicos tem como premissa o rompimento das ligações entre os carboidratos e a lignina. Nesse aspecto, o primeiro setor industrial a se interessar pelo uso de enzimas foram as fábricas de celulose e papel, quando as enzimas começaram a se tornar viáveis para branquear celulose e substituir o cloro elementar, com redução na liberação de organoclorados persistentes nos ambientes naturais. O rompimento das cadeias de xilana pela xilanase separa as ligações de lignina-carboidrato, que ocorrem após o período de cozimento, melhorando o acesso dos reagentes de branqueamento e facilitando a remoção da lignina em subseqüentes seqüências químicas de branqueamento. Posteriormente, enzimas com ação direta sobre a oxidação e despolimerização da lignina presente nas fibras tornaram-se alvo de estudos.

Geralmente a produção de enzimas por fungos é estudada em meios sintéticos, muitas vezes contendo indutores enzimáticos. Portanto, os resultados nem sempre refletem os acontecimentos dos sistemas *in situ* ou *in vivo*. Uma alternativa promissora tem sido o uso de materiais lignocelulósicos como substrato indutor para a produção de diferentes enzimas, garantindo, assim, a produção de enzimas de alta especificidade, atuando como catalisadores para tornar os processos mais efetivos e baratos. Existem poucos estudos na literatura descrevendo a produção de enzimas em larga escala por fungos crescendo sobre seu substrato natural em condições de fermentação em meio sólido, sistema mais próximo do processo *in vivo*.

A produção industrial de enzimas pode ser feita em reatores especiais nos quais se colocam fungos. Como substratos, podem ser usados resíduos agrícolas ou florestais. Alguns estudos científicos e tecnológicos foram publicados sobre processos biotecnológicos em pilhas de cavacos. Tal processo, denominado biopolpação, consiste na inoculação de fungos especializados nas pilhas de cavacos para promover a deslignificação. O reator pode ser a própria pilha de cavacos, ou, eventualmente, um enorme silo de cavacos especialmente criado para oferecer melhores condições de aeração, umidade e temperatura. Os fungos inoculados nos cavacos produzem quantidades significativas de enzimas ligninolíticas, capazes de degradar seletivamente a lignina dos cavacos. A biopolpação de cavacos de madeira é uma ótima possibilidade para integrar a produção de enzimas e aplicação em outras etapas operacionais. Como as enzimas são extracelulares, elas podem ser facilmente separadas do substrato para serem usadas, por exemplo, na etapa de branqueamento da celulose.

16.2 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

No processo de degradação da parede celular vegetal atua um grupo de hidrolases, enzimas responsáveis pela degradação da celulose e das polioses que apresentam certa especificidade pelo respectivo substrato, ao passo que as enzimas envolvidas na degradação da lignina são oxidases, que em geral são pouco específicas¹ (Figura 16.1).

As enzimas hidrolíticas necessárias à degradação da celulose são as endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glicosidase. Endoglucanases hidrolisam ligações glicosídicas, particularmente em regiões amorfas da celulose, expondo novos terminais livres que serão locais de atuação das exoglucanases. Exoglucanases ou celobio-hidrolases hidrolisam ligações glicosídicas das pontas de cadeia da celulose, produzindo celobiose. β -glicosidases clivam a molécula de celobiose em duas unidades de glicose. Em adição às enzimas citadas, uma quarta enzima, a celobiose desidrogenase, atua sobre celobiose, oligômeros de glicose e celulose, oxidando o terminal redutor. Trabalhos recentes descreveram uma mono-oxigenase lítica dependente de cobre, capaz de quebrar a cadeia de celulose pela oxidação das moléculas de anidropirano nos carbonos C1 ou C4^{2,3}.

Dada a heterogeneidade do substrato, a hidrólise das hemiceluloses é mais complexa, sendo necessária a ação de endo-1,4- β -xilanase, β -xilosidase

Frente à complexidade e à diversidade dos constituintes, a parede celular dos vegetais é degradada principalmente por fungos, em especial por basidiomicetos que causam a decomposição branca. Esses fungos agem através da penetração de suas hifas pelo lúmen das células, as quais ali instaladas produzem uma variedade de metabólitos extracelulares que vão, assim, atuar degradando os componentes da parede celular vegetal. A característica comum desses fungos é a capacidade de degradar lignina, assim como celulose e polioses. Entretanto, as velocidades relativas de decomposição da lignina e polissacarídeos variam grandemente de acordo com a espécie fúngica. Esta classe de fungos pode ser distinguida em dois grupos: o grupo dos fungos que degradam simultaneamente todos os componentes lignocelulósicos e o grupo dos fungos que degradam primeiramente a lignina e a hemicelulose, preservando a celulose (Figura 16.2). Embora o nível de cada atividade enzimática varie entre os fungos, em geral eles não são bons produtores de celulases, e a seletividade de alguns está relacionada a uma atividade de celulase total baixa.

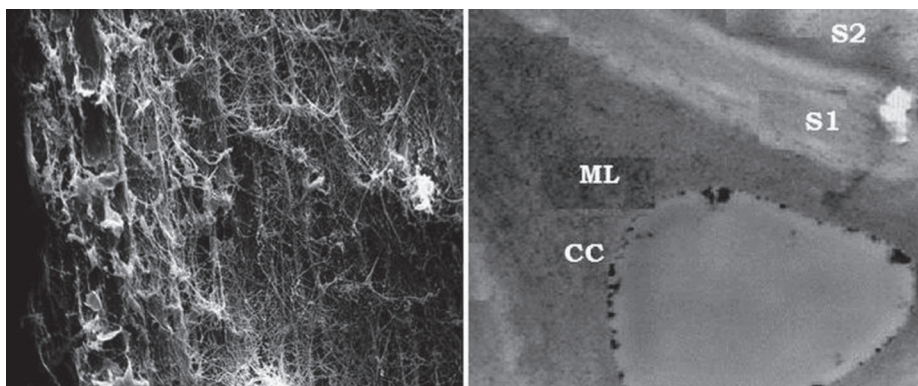


Figura 16.2 Micrografia do crescimento de um fungo de degradação branca seletiva em material lignocelulósico e características micro-morfológicas da degradação da parede celular (CC – canto da parede celular; ML – lamela média; S1, S2 – camadas da parede celular).

16.2.1 Aspectos relevantes da produção e caracterização das enzimas de fungos cultivados em madeira

Numerosos estudos são descritos na literatura a respeito da produção e caracterização de enzimas lignocelulolíticas por fungos pertencentes à classe

Basidiomicotina, degradadores de madeira. A maioria desses estudos, porém, tem sido conduzida em meios de cultura líquidos, quimicamente definidos, geralmente na presença de indutores enzimáticos e sob condições controladas de tensão de oxigênio, temperatura, pH, agitação etc.

Em ambientes naturais, os fungos colonizam e crescem sobre seu substrato sólido de forma muito diferente da que ocorre em culturas submersas, utilizadas na maioria dos estudos de degradação de lignina ou celulose. Consequentemente, essa diferença nas condições de crescimento deve afetar a expressão da bateria enzimática que compõe o sistema lignocelulolítico dos fungos. Alguns poucos estudos na literatura descrevem a produção de enzimas durante o crescimento dos fungos sobre madeira. Na maioria destes, técnicas imunocitoquímicas são utilizadas para demonstrar a localização das enzimas lignocelulolíticas no substrato⁸.

Sethuraman et al.⁹ demonstraram que o padrão de produção das enzimas é extremamente dependente da fonte de carbono utilizada. Os autores afirmam que *Ceriporiopsis subvermispora*, um fungo causador de podridão branca da madeira e conhecido devido à sua habilidade de degradar lignina seletivamente¹⁰, apresentou uma baixa atividade celulolítica, mas uma alta atividade hemicelulolítica e ligninolítica quando cultivado em meios com glicose, celobiose e celulose Avicel ou Whatman. Considerando a atividade celulolítica, detectou-se atividade para as endocelulases e quantidades não significantes de atividade para exocelulases. Esse fungo apresentou um crescimento restrito sobre substratos de celulose cristalina devido à falta de um sistema celulolítico completo, o que acarreta uma degradação limitada dos componentes celulósicos.

Como, em extratos obtidos durante a biodegradação de *Pinus radiata*¹¹ e *Eucalyptus grandis*¹² por esse fungo, a atividade de manganês peroxidases (MnPs) é abundante, tais enzimas, produzidas em um eventual processo operado em escala industrial, poderiam ser recuperadas por extração dos cavacos biodegradados previamente à polpação propriamente dita¹³ e aproveitadas para fins variados¹⁴.

À semelhança do observado para outros fungos, as MnPs produzidas por *C. subvermispora* apresentam-se como múltiplas isoenzimas. Tal multiplicidade pode implicar em diferenças nos espectros de ação e nas concentrações de Mn^{2+} e H_2O_2 requeridas por cada uma delas para oxidar compostos com estruturas distintas¹⁵.

Na sequência são apresentados dados de um estudo em que *C. subvermispora* foi utilizado para a produção de enzimas a partir de cavacos de *E. grandis* na presença ou ausência de conutrientes, glicose e milhocina¹⁶⁻¹⁷.

16.2.1.1 Produção de micélio e biodegradação da madeira

A produção de micélio como inóculo é usada principalmente com fungos que não esporulam ou que apresentam dificuldade de esporulação. Nesse caso, é requerido inicialmente o cultivo em meio sólido e, após o período de incubação, discos com diâmetro definido são transferidos para frascos contendo meio líquido, em reatores convencionais com aeração (Figura 16.3a). Após o período de incubação, o micélio obtido é filtrado, lavado e triturado em homogeneizadores com tempo e velocidade padronizados. A determinação e calibração da concentração do inóculo exigem maiores cuidados e padronizações dos procedimentos, a fim de garantir a repetibilidade dos experimentos. Para isso, uma amostra da suspensão de micélio é seca e pesada para determinação da massa seca de fungo presente numa alíquota dessa suspensão. Uma perfeita colonização de cavacos pode ser obtida usando-se uma concentração inicial de micélio igual a 500 mg por quilo de madeira (massa seca).

Além da padronização da concentração de inóculo, é fundamental empregar inóculo viável. Para tanto, recomenda-se o cultivo em reatores com injeção de ar e com o menor nível possível de cisalhamento¹⁸ (Figura 16.3b).



Figura 16.3 (a) Biorreator agitado por pás e (b) de baixo cisalhamento com agitação e aeração por tubo em L.

Previamente à inoculação de cavacos de madeira, estes devem ser mantidos em água destilada por um período de 12 a 16 horas. Após a drenagem da água, os cavacos terão umidade de 60%. A operação de inoculação é feita por aspersão, quando então são adicionados o(s) de(s)vido(s) cossubstratos e a suspensão de micélio fúngico ou, alternativamente, por inoculação por semente, utilizando cavacos pré-cultivados com fungo.

O cultivo em biorreatores pode ser realizado de formas diferentes; no entanto, o que mais se recomenda para cavacos é a utilização de um sistema aerado, utilizando-se fluxo de ar igual a 23 L/h e com agitação intermitente, tipo tambor rotativo. Na ausência desses reatores, podem-se utilizar baldes de polietileno fechados com tampa e com uma entrada para ar¹⁹ (Figura 16.4).



Figura 16.4 Biorreator aerado com ar umidificado com cavacos de madeira, inoculado com *Ceriporiopsis subvermispora*.

Embora o sistema de cultivo em meio sólido seja o sistema preferido para a produção de muitas enzimas de interesse industrial por fungos filamentosos, a recuperação dessas enzimas do substrato é um processo laborioso e complexo, principalmente quando substratos lignocelulósicos são utilizados. Não existe uma metodologia padrão descrita na literatura para a recuperação de proteínas desses substratos sólidos. Isto se dá porque os processos de recuperação ou extração dependem do micro-organismo utilizado, tipo

do substrato (natureza, tamanho de partícula, porosidade etc.) e do tipo de proteína a ser extraída. Segundo Leatham et al.²⁰, é importante compreender as limitações da extração de enzimas desde substratos lignocelulósicos. Os autores afirmam que, no caso de madeira, pode-se assumir que somente as enzimas presentes sobre as superfícies hidratadas e expostas desse substrato podem ser extraídas.

Dentre os fatores mais importantes a serem considerados na recuperação das enzimas a partir dos cavacos, estão a natureza da solução de extração, concentração, volume e pH. Também devem ser consideradas as condições de extração, tais como temperatura e agitação, e a quantidade de extrações feitas para recuperação da maior parte da atividade²⁰⁻²¹.

Proteínas microbianas extracelulares produzidas durante a degradação de madeira podem estar ligadas à membrana celular do micro-organismo, adsorvidas na superfície da madeira ou formando agregados dentro do lúmen das células da madeira, devido à natureza hidrofóbica das proteínas²². Por esse motivo, é essencial a utilização de soluções com forças iônicas apropriadas e agentes solubilizantes de membrana para melhorar o rendimento da recuperação enzimática.

O número de extrações necessárias para máxima recuperação enzimática parece ser um assunto mais difícil de estabelecer, uma vez que, dependendo da enzima, às vezes até a quarta extração ainda é possível detectar uma atividade significativa. Porém, após duas extrações consecutivas, na maioria das vezes é possível recuperar mais de 80% da atividade, para a maioria das enzimas estudadas²³.

As enzimas recuperadas durante a extração correspondem a enzimas extracelulares que estão associadas ou adsorvidas ao micélio fúngico e às superfícies expostas dos cavacos. Extratos preparados a partir dos cavacos biodegradados por *C. subvermispota* suplementados (CN) ou não (SN) com nutrientes, glicose (0,5% m/m) e milhocina (0,5% m/m) foram analisados quanto à atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas (Tabela 16.1), confirmando o alto potencial ligninolítico e a baixa capacidade celulolítica exibidos pelo fungo²⁴.

Com relação à atividade de MnPs, verificou-se que esta aumentou gradativamente durante o período de biodegradação, tanto na presença quanto na ausência de nutrientes; na presença de nutrientes, entretanto, a atividade de MnPs foi sempre consideravelmente superior, independentemente do tempo de cultivo.

Tabela 16.1 Atividades enzimáticas (UI/Kg de madeira seca) determinadas nos extratos preparados a partir dos cavacos de *E. grandis* biodegradados por *C. subvermispora* durante diferentes períodos, na presença (CN) ou ausência (SN) de conutrientes

| ENZIMA | 7 DIAS | | 14 DIAS | | 28 DIAS | |
|----------------------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | SN | CN | SN | CN | SN | CN |
| Endoglucanases | 54 | 135 | 133 | 275 | 110 | 137 |
| Celobio-hidrolases | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| β-glicosidases | 9 | 16 | 15 | 23 | 87 | 132 |
| Xilanases | 260 | 402 | 376 | 541 | 123 | 252 |
| β-xilosidases | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mananases | 381 | 385 | 213 | 267 | 87 | 75 |
| Lacases | 10 | 6 | 2 | 1 | 6 | 29 |
| Manganês peroxidases | 430 | 1.013 | 765 | 2.066 | 896 | 2.323 |
| Lignina peroxidases | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Após o cultivo, podem-se avaliar os compostos aromáticos e hemeproteínas dos extratos com medidas de absorbâncias em 280 nm²⁵ e 405 nm²⁶, respectivamente (Figura 16.5). Dessa forma, a variação da concentração dos produtos de degradação da lignina com o tempo de cultivo pode ser estimada através da multiplicação dos valores de absorbância em 280 nm pelos respectivos fatores de diluição empregados nas análises. Ressalta-se, porém, que a adição de conutrientes aos cavacos de madeira previamente ao cultivo do fungo aumenta a velocidade de biodegradação em cerca de 40% (Figura 16.6).

16.2.1.2 Métodos utilizados para a limpeza e concentração de proteínas extracelulares de fungos

Apesar da vantagem do uso dos materiais lignocelulósicos para a produção de enzimas ligninolíticas, estes são ricos em compostos indesejáveis como lignina, extrativos, resinas etc., sendo este um dos problemas encontrados para a caracterização de proteínas e enzimas de fungos cultivados em materiais lignocelulósicos.

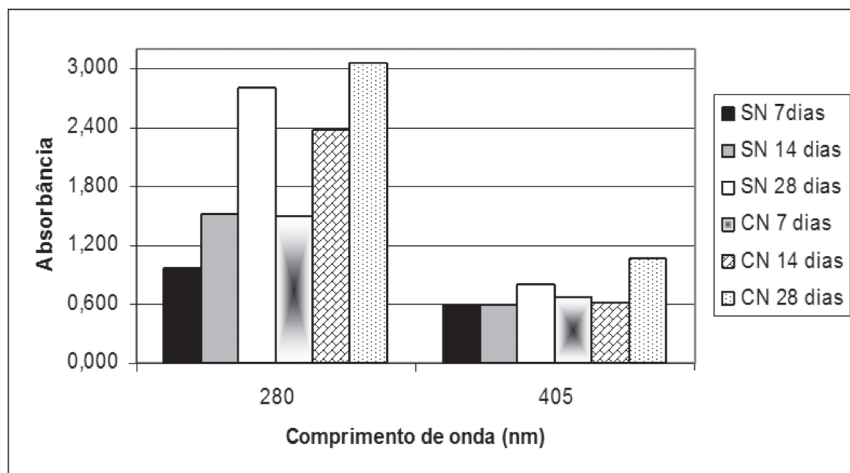


Figura 16.5 Absorbâncias, a 280 nm (extratos diluídos) e a 405 nm (extratos não diluídos), dos extratos obtidos ao longo dos cultivos na presença (CN) ou ausência (SN) de conutrientes.

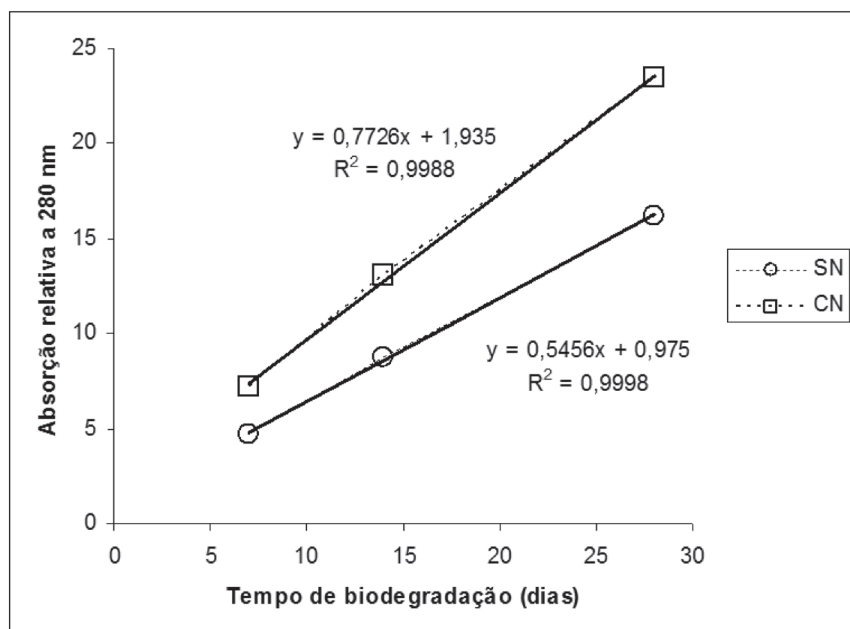


Figura 16.6 Absorção relativa a 280 nm dos extratos enzimáticos obtidos ao longo dos cultivos conduzidos na presença (CN) ou ausência (SN) de conutrientes.

As proteínas podem ligar-se a compostos fenólicos em meio aquoso através de diferentes mecanismos, como ligações iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O produto resultante da degradação de ligninas é mais hidrofóbico e suscetível à agregação e precipitação da proteína. Algumas características estruturais das proteínas, como regiões ricas em prolina, predispõem-nas à formação do complexo. Compostos fenólicos podem também formar ligações covalentes irreversíveis com proteínas como uma consequente oxidação a quinonas.

Tanto os compostos fenólicos não oxidados quanto as quinonas reagem com as proteínas e inativam as enzimas ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas, em géis ou resinas. Portanto, é necessária a remoção dessas substâncias para que o procedimento de separação e identificação das proteínas apresente um resultado sem interferências, devendo ser incluídos nos procedimentos de purificação de proteínas métodos capazes de eliminar compostos que prejudiquem as técnicas analíticas de determinação de proteínas e atividades enzimáticas e a eletroforese.

Além de interferir na quantificação e caracterização de proteínas, a presença de extrativos e derivados de lignina também interfere na determinação de atividades enzimáticas^{11,27}. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos adequados para a remoção seletiva dos contaminantes presentes nos extratos é uma parte importante de trabalhos que visam purificar e caracterizar enzimas de interesse produzidas durante a biodegradação de materiais lignocelulósicos.

Um número diferente de métodos já foi estudado para a remoção das substâncias provenientes da madeira e que conferem uma cor marrom ao extrato enzimático. A extração de proteínas com ácido tricloro acético (TCA), fenol, e mesmo a remoção prévia dos extrativos da madeira em água, foram técnicas empregadas com o objetivo de se obter preparações proteicas mais limpas e com menos contaminantes. A extração de cavacos em água ou etanol/água previamente à inoculação de fungos em madeiras mostrou-se bastante eficiente na remoção de compostos aromáticos²⁸.

Para a remoção de compostos aromáticos presentes em extratos de materiais lignocelulósicos biodegradados pode-se usar também a polivinilpirrolidona (PVPP) que tem origem na polimerização da vinilpirrolidona, sendo o produto obtido formado por macromoléculas em rede. A adsorção de polifenóis por PVPP se dá através da OH do polifenol e do grupo carbonila de PVPP, juntamente com a sobreposição (elétrons desemparelhados) das interações polares e hidrofóbicas entre o anel aromático do polifenol e o anel de PVPP. Em um trabalho realizado por Magalhães²⁹, foram testadas

concentrações de PVPP entre 1,0% e 5,0%; entretanto a máxima redução na absorbância a 280 nm obtida, utilizando-se 5,0% de PVPP, foi de apenas 8,5%. De acordo com Toth e Pavia³⁰, a eficiência de PVPP na adsorção de compostos aromáticos é aumentada em menores valores de pH, por haver favorecimento da formação de pontes de hidrogênio entre adsorvente e adsorbato.

Resinas de troca iônica também podem ser empregadas para limpeza de extratos enzimáticos. A limpeza de extratos enzimáticos em resinas de troca iônica tem por objetivo remover eficientemente não só grande parte da cor dos extratos, mas também compostos fenólicos, ácidos orgânicos e inorgânicos, compostos furânicos e metais, contaminantes que podem interferir na obtenção dos resultados da purificação. As resinas de troca iônica são constituídas por um esqueleto tridimensional ao qual se fixam os grupos ativos. Estas permitem trocar os íons não desejáveis da solução problema por aqueles que se encontram saturando os grupos funcionais da resina. Um estudo conduzido com o extrato de cultivo de *C. subvermispota* exemplifica a possibilidade de extração das MnPs em coluna empacotada com resina trocadora de ânions (DEAE Sepharose) em pH 4,8 (Figura 16.7). Sabe-se que as MnPs produzidas por *C. subvermispota* apresentam pontos isoelétricos (pIs) que variam entre 3,2 e 4,4²⁷. Por outro lado, os contaminantes encontrados em extratos preparados a partir de madeira biodegradada normalmente apresentam pK_a s em valores básicos da escala de pH³¹.

Toda a atividade de MnPs contida em 50 mL do extrato foi adsorvida em 10 mL de resina, sem levá-la a indícios de saturação (Figura 16.7a). A Figura 16.7b mostra que a absorbância a 280 nm foi inferior àquela encontrada no extrato bruto em todas as frações obtidas durante o procedimento experimental. Esse procedimento evidencia a possibilidade do emprego de extração em fase sólida como uma etapa que, além de levar à concentração das enzimas de interesse, minimiza a concentração de compostos que absorvem a 280 nm, mas não têm afinidade pela resina.

O carvão ativado é um excelente adsorvente de compostos que absorvem a 280 nm, graças à sua alta área superficial e à presença de uma variedade de grupos funcionais em sua superfície. O oxigênio é o principal átomo que aparece na rede de carbono, presente principalmente nos grupos funcionais carbonila, carboxila, hidroxila e enois. Esses grupos superficiais influenciam a reatividade e as propriedades de adsorção do material.

Tem-se estabelecido que a principal forma de interação entre fenol e carvão ativado é através da ligação entre os elétrons do sistema π , ou seja, os elétrons π do anel aromático do fenol ligam-se ao sistema π das camadas

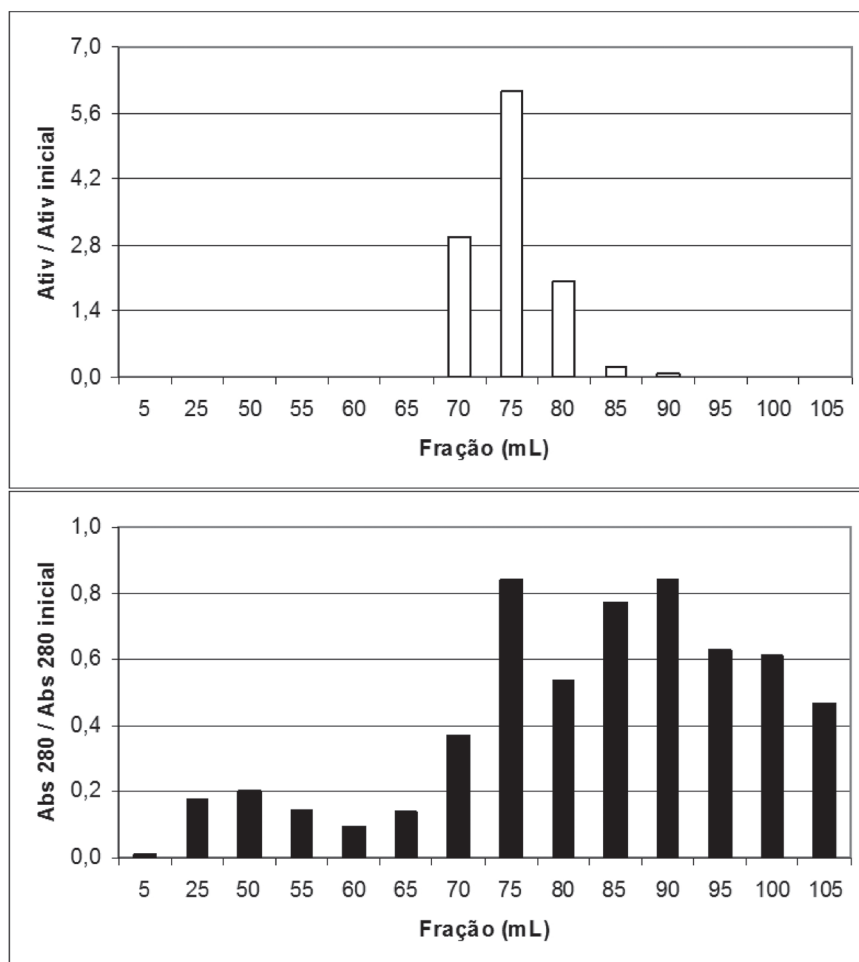


Figura 16.7 Relação entre a atividade de MnPs no eluato e no extrato de *C. subvermispora* (a) cultivado em madeira e nutrientes (CN) e (b) entre a absorbância a 280 nm no eluato e no extrato CN, respectivamente efluente e afluente, durante as etapas de carregamento (0 mL a 50 mL), lavagem (55 mL a 60 mL) e eluição (65 mL a 105 mL) da coluna empacotada com a resina DEAE Sepharose em pH 4,8. Concentração de NaCl utilizada na eluição: 65 mL (0 M a 0,1 M), 70 mL (0,1 M), 75 mL (0,1 M a 0,2 M), 80 mL (0,2 M), 85 mL (0,2 M a 0,3 M), 90 mL (0,3 M), 95 mL (0,3 M a 0,4 M), 100 mL (0,4 M), 105 mL (0,4 M a 0,5 M).

gráficas do carvão. Essa interação ocorre paralelamente ao plano basal do carvão ativado.

A partir de estudos de adsorção de extratos enzimáticos com atividade de MnP em carvão ativado ficou demonstrado que a concentração necessária para alcançar alta eficiência de adsorção depende do tempo de biodegradação

dos cavacos e da presença ou ausência de nutrientes durante o cultivo do fungo. Extratos mais “limpos”, em geral, apresentam menor seletividade na remoção de compostos que absorvem em 280 nm durante a adsorção em carvão ativado¹⁷.

A seguir, serão apresentados dados de recuperação da atividade de MnPs de extratos preparados a partir dos cavacos biodegradados por 7, 14 e 28 dias submetidos à adsorção em carvão ativado, variando-se a concentração de carvão de forma a maximizar a recuperação (Tabela 16.2).

Tabela 16.2 Valores percentuais de atividade de MnPs e de absorção relativa a 280 nm remanescentes nos extratos enzimáticos após adsorção em concentrações selecionadas de carvão ativado

| EXTRATO | CARVÃO (% M/V) | ATIVIDADE (%) | ABSORÇÃO A 280 NM (%) |
|------------|----------------|---------------|-----------------------|
| SN 7 dias | 0,5 | 90,7 | 59,4 |
| SN 14 dias | 1,5 | 93,1 | 35,8 |
| SN 28 dias | 3,0 | 85,2 | 26,9 |
| CN 7 dias | 1,0 | 92,6 | 40,3 |
| CN 14 dias | 2,0 | 98,5 | 35,3 |
| CN 28 dias | 3,0 | 102,7 | 30,3 |

Cultivo em madeira na presença (CN) ou ausência (SN) de nutrientes.

Conforme pode ser observado, dependendo do extrato e da concentração de carvão ativado utilizados, foi possível remover entre 40% e 75% da absorção a 280 nm com apenas pequenas perdas na atividade de MnPs, inferiores a 15%.

Na sequência, os extratos foram submetidos à recuperação das enzimas com o auxílio da resina DEAE Sepharose em pH 4,8; que foi seguida pela eluição no mesmo tampão, adicionado de NaCl 0,2 M (Tabela 16.3).

Tabela 16.3 Atividade de MnPs, absorção relativa a 280 e a 405 nm e concentração de proteínas, determinados nos extratos após o condicionamento com carvão ativado e resina trocadora de ânions

| EXTRATO | ATIVIDADE(UI/ML) | ABSORÇÃO A 280 NM | ABSORÇÃO A 405 NM | PROTEÍNAS (MG/ML) |
|------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| SN 7 dias | 3,63 | 15,02 | 0,85 | 0,16 |
| SN 14 dias | 12,27 | 12,74 | 1,08 | 0,17 |

| EXTRATO | ATIVIDADE(UI/ML) | ABSORÇÃO A 280 NM | ABSORÇÃO A 405 NM | PROTEÍNAS (MG/ML) |
|------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| SN 28 dias | 7,81 | 40,55 | 1,50 | 0,22 |
| CN 7 dias | 14,39 | 31,80 | 1,89 | 0,35 |
| CN 14 dias | 23,50 | 34,30 | 2,69 | 0,24 |
| CN 28 dias | 20,02 | 50,35 | 2,43 | 0,39 |

A Tabela 16.3 mostra que, após o condicionamento com carvão ativado e resina trocadora de ânions, as atividades de MnPs chegaram a valores de até 23,50 UI/mL. Embora os valores de absorção relativa a 280 nm tenham sido superiores àqueles determinados nos respectivos extratos brutos, os aumentos nos valores de atividade de MnPs (superiores a 30 vezes) foram muito mais expressivos que os aumentos nos valores de absorção relativa a 280 nm (inferiores a 5 vezes). Apesar disso, picos de absorção de luz no comprimento de onda de 405 nm, típicos de hemeperoxidasas purificadas, foram observados apenas nos extratos SN 14 dias, CN 14 dias e CN 28 dias (Figura 16.8).

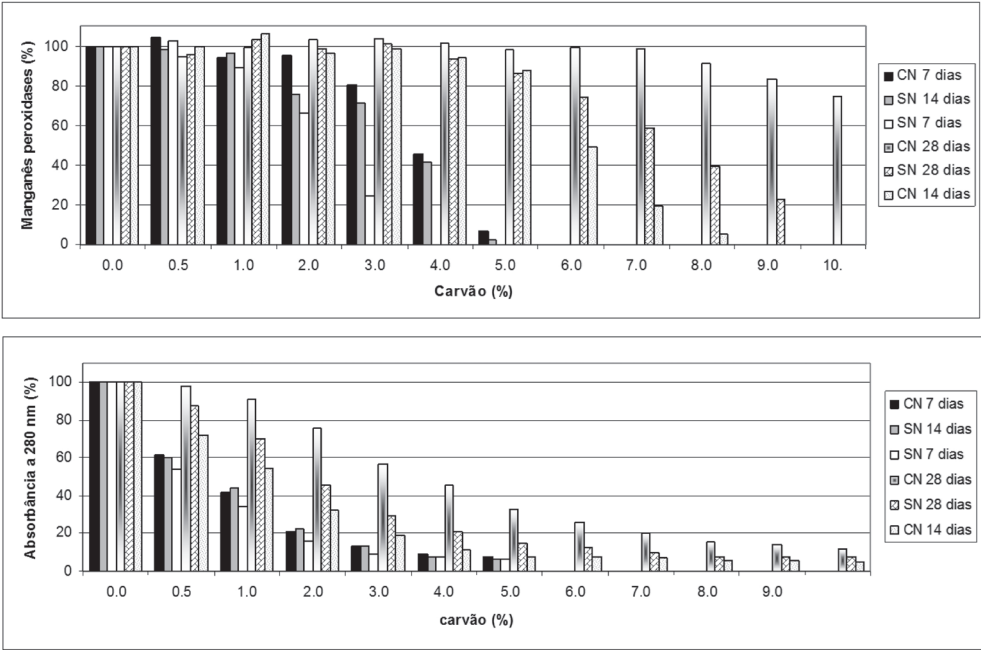


Figura 16.8 Espectros de absorção relativa obtidos após o condicionamento dos extratos com carvão ativado e resina trocadora de ânions.

O fato de os aumentos nos valores de absorção relativa a 405 nm (1,9 a 4,5 vezes) terem sido muito menores que aqueles esperados com base nos valores de atividade de MnPs (33,9 a 105,8 vezes) demonstra que o condicionamento dos extratos acarreta a remoção de inibidores da atividade enzimática. Comportamento semelhante, observado durante a extração de MnPs com uma outra resina trocadora de ânions (Q Sepharose), também foi reportado por Lobos e colegas²⁷.

A caracterização do perfil de bandas proteicas e de atividade enzimática MnPs nos extratos secretados pelo fungo foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando-se sistema descontínuo³⁰. As bandas de proteínas foram reveladas com nitrato de prata, após eletroforese em condições desnaturantes. A presença de bandas com atividade de MnPs foi detectada após eletroforese em condições não desnaturantes, empregando-se mistura constituída por 1,75 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 3,2), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,5 mL de sulfato de manganês 1 mM, 0,25 mL de albumina bovina 1,8%, 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,25 mL de extrato enzimático.

Carvalho et al.¹⁶ separaram duas bandas proteicas principais, com massas molares relativas (M_r) iguais a $46,8 \pm 0,6$ KDa e $51,6 \pm 1,0$ KDa, dos extratos preparados a partir dos cavacos biodegradados; tanto na presença (CN) quanto na ausência (SN) de conutrientes. Nos cultivos não suplementados, essas duas bandas foram claramente visualizadas nos extratos obtidos após 28 dias de biodegradação (SN 28 dias); nos suplementados, após 14 dias (CN 14 dias). A atividade de MnPs foi confirmada pela coloração dos respectivos géis com vermelho de fenol em presença de H_2O_2 após eletroforese sob condições não desnaturantes, com bandas bastante difusas tendo sido geralmente observadas (Figura 16.9).

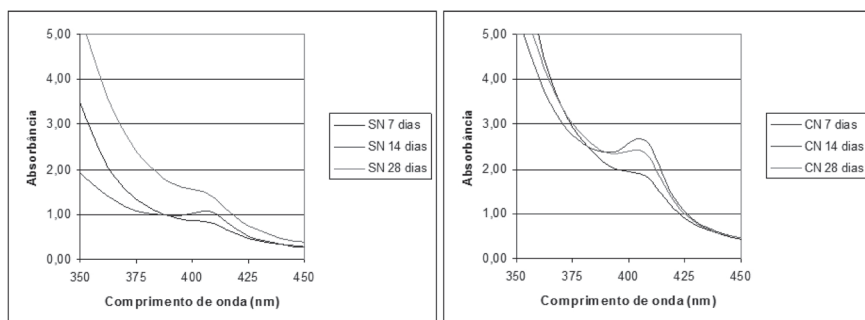


Figura 16.9 Espectros de absorção relativa obtidos após o condicionamento dos extratos com carvão ativado e resina trocadora de ânions.

Para a obtenção de bandas bem definidas e livres de artefatos, os extratos tiveram que passar por condicionamento. Portanto, a avaliação do resultado é difícil em virtude de haver alguma alteração composicional nesta etapa. Esse procedimento limita o analista a concluir que a suplementação nutricional altera o padrão das principais proteínas extracelulares produzidas pelo fungo. Como demonstrado nos exemplos anteriores, a suplementação nutricional apenas acelera o desenvolvimento do micro-organismo sobre os cavacos da madeira.

16.3 USO DE ENZIMAS OXIDATIVAS NO BIOBRANQUEAMENTO DE POLPAS CELULÓSICAS

O branqueamento é um tratamento que tem como objetivo aumentar a alvura e limpeza de polpas celulósicas cuja maior parte da lignina foi removida por algum tratamento. A remoção da lignina residual de polpas normalmente é conduzida em uma sequência multiestágios, com o uso de produtos clorados, oxigênio, ozônio ou peróxido de hidrogênio, variando de acordo com o grau de alvura desejado. As enzimas oxidativas podem ser um desses agentes, pois, como já descrito, agem na lignina através da formação inicial de um radical catiônico que induz a ruptura de ligações e a consequente degradação química dos intermediários formados.

A descrição de vários fungos eficientes em degradar lignina possibilitou os estudos de aplicação em processos industriais, como um meio de melhorar a seletividade dos processos de polpação e de branqueamento³¹. Mais recentemente, experimentos laboratoriais de deslignificação por fungos também têm sido realizados para produção de bioetanol^{32,33}. A modificação, degradação e remoção da lignina por fungos diminuem a recalcitrância do material lignocelulósico. Isso poderia ser traduzido em economia de produtos químicos de polpação e/ou pré-tratamento. Entretanto, como os fungos demandam um longo tempo para causar modificações na estrutura do material lignocelulósico, são inviáveis para o uso industrial.

As enzimas oxidativas são de interesse para diversos processos industriais de transformação que envolva lignina ou outros compostos aromáticos. Alguns fatores dificultam a aplicação de enzimas, dentre os quais os mais importantes são o volume requerido de enzima e as condições dos processos, uma vez que as enzimas fúngicas atuam normalmente na temperatura de 30 °C a 40 °C e em pH de 3 a 5. Porém, em estudos de bio-polpação em escala laboratorial, antes de serem processados, os cavacos

biodegradados são lavados com um volume de líquido/sólido na razão de 3:1 (v/p). O extrato enzimático obtido é rico principalmente em xilanases e Mn-peroxidases^{11,14,34}. Tais enzimas são potencialmente importantes em biobranqueamento de polpas celulósicas, em que a lignina é removida quase completamente após o processo de polpação, porém uma parte é capaz de permanecer na polpa interferindo na qualidade do produto final³⁵.

16.3.1 Uso de lacases

As lacases são enzimas que, para degradar a lignina, necessitam primeiramente oxidar mediadores que, por sua vez, atuam como agentes oxidantes da lignina residual presente em polpas celulósicas. Na ausência de mediador, a lacase age polimerizando a lignina em vez de degradá-la. O primeiro mediador de lacase testado para oxidar a lignina foi o *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid* (ABTS). O uso de ABTS não tem utilidade prática por ser um composto tóxico e de custo incompatível com os processos de deslignificação. Muitos estudos já foram realizados em busca de outros mediadores eficientes na degradação de lignina, menos tóxicos e de baixo custo. Um mediador redox ideal deve ser um bom substrato para lacase, suas formas oxidadas e reduzidas devem ser estáveis durante o ciclo redox do mediador, desempenhando, dessa forma, muitos ciclos de reação sem sua degradação³⁶. O 1-hidroxibenzotriazol (HBT) é um mediador bastante eficiente para os processos de deslignificação, embora apresente custo elevado. Metabólitos fúngicos como o ácido 3-hidroxiantranílico³⁷ e compostos derivados de lignina, principalmente compostos fenólicos³⁸, também já foram testados, porém não apresentaram a mesma eficiência do HBT³⁹⁻⁴⁰. Como a ação da enzima é essencialmente oxidativa, e não de mineralização completa da lignina, o tratamento requer uma etapa subsequente de extração alcalina para remover a lignina oxidada, de forma muito similar ao que se observa nos sistemas de branqueamento químico.

As condições de tratamento com lacase requerem um pH entre 4,5 a 6,0, e a temperatura não ultrapassa os 50 °C. Os níveis de utilização da enzima em geral são elevados. Trabalhos recentes mostram níveis de produção de lacase tão elevados quanto 740 U/mL⁴¹. Assim, é importante definir o melhor ponto de aplicação da lacase no processo de branqueamento, a fim de manter a maior eficiência catalítica e diminuir a carga empregada no branqueamento. A melhor performance da lacase tem sido obtida com polpas tratadas com oxigênio (*kraft*/O₂), e não com as polpas marrons saídas do reator principal.

No entanto, isso parece depender claramente do tipo de polpa empregado, e seria necessário avaliar essa questão para cada caso que se faça necessário.

Call e Muncke⁴⁰ otimizaram as cargas de enzimas, mediador, pH e temperatura de reação obtendo 57% de deslignificação da polpa celulósica, medido pelo número kappa. Em uma etapa subsequente, a condição otimizada do branqueamento foi avaliada em uma planta piloto, e o resultado de deslignificação foi confirmado. Como consequência, a alvura da polpa aumentou de 38% para 55% ISO. Com uma etapa de branqueamento posterior utilizando o peróxido de hidrogênio, a alvura final atingiu o valor de 76,5% ISO.

Esse não foi o único ensaio de tratamento de polpas com lacase em escala piloto. Ibarra e colegas⁴² usaram sequências de branqueamento combinando oxigênio, lacase e peróxido de hidrogênio e observaram que nas sequências com lacase as polpas finais resultaram em menor número kappa do que as obtidas nas sequências sem lacase. A alvura das polpas em questão foi proporcional à remoção de kappa, sendo 91,2% ISO na sequência que incluía lacase contra 87,9% no controle.

O elevado custo dos mediadores tem sido o maior entrave no emprego de branqueamento com lacases. Camarero et al.⁴³ avaliaram o uso de mediadores alternativos, por exemplo, os compostos nitrogenados frequentemente usados na indústria de alimentos, assim como compostos fenólicos correlacionados com subestruturas de lignina. A acetosiringona destacou-se entre os mediadores, tanto para a redução de kappa quanto para a elevação da alvura da polpa; entretanto, comparado ao HBT, os mediadores testados foram menos eficientes.

A demanda por mediadores é da ordem de 10 Kg/t de polpa. Contudo, o uso de fenóis derivados da lignina ou misturas de licor *kraft* poderiam ser utilizados. Compostos fenólicos gerados a partir da degradação de substratos lignocelulósicos por fungos têm sido usados como modelos de mediadores de lacase para descoloração de corantes reativos³⁸.

Outro aspecto relevante nos estudos de branqueamento com lacases é que, dependendo da origem da lacase, obtêm-se diferenças de deslignificação³⁹.

16.3.2 Uso de MnP

O uso de MnP no branqueamento de polpas promove altos níveis de deslignificação e de alvura, mas requer a presença de vários coadjuvantes no meio reacional. Para a MnP atuar é necessária a presença de um

ácido orgânico como láctico, oxálico ou malônico, MnSO_4 , Tween 60 ou outra mistura surfactante rica em ácido graxo poli-insaturado e H_2O_2 . Este último deve ser adicionado preferencialmente de forma contínua ao longo da reação.

Os estudos de branqueamento com MnP purificada de *Phanerochaete sordida* em polpas celulósicas com kappa inicial de 17 e alvura de 31,8% resultou após uma extração alcalina em uma polpa com kappa 11 e alvura de 44%. Ao se repetir essa sequência MnP/álcali por seis vezes obteve-se uma polpa com 75% de alvura. Esse ensaio foi obtido com elevadas cargas de enzima (100 UI/g de polpa) por um tempo prolongado de 24 horas. A presença de ácidos graxos insaturados, sulfato de manganês e peróxido de hidrogênio foi fundamental para alcançar o resultado positivo de branqueamento. O efeito branqueador da MnP está relacionado a reações de peroxidação de lipídeos, que, ao gerar radicais organoperoxila, atuam na degradação da lignina¹⁴.

O uso de MnP imobilizada proporcionou a geração de Mn^{3+} ou radicais organoperoxila quando uma solução contendo MnSO_4 , H_2O_2 , ácido malônico e Tween 80 foi passada pela coluna de imobilização. A reação enzimática foi conduzida a 40 °C e os produtos da reação foram eluídos e transferidos para o reator de branqueamento a 70 °C. A alvura da polpa obtida alcançou 88% após sete ciclos de branqueamento enzimáticos seguidos de extração alcalina⁴⁴.

Um estudo de branqueamento de polpas em um reator de quatro litros com a sequência composta por MnP/quelante/peróxido de hidrogênio alcalino e carga de enzima de 20 U/g de polpa resultou numa polpa com 86% de alvura em relação ao controle de 80%, cujas propriedades mecânicas não foram alteradas.

Um fator que afeta a eficiência da MnP é o tipo de quelante usado para os íons Mn_3^+ . Feijoo et al.⁴⁵ avaliaram diversos quelantes durante o teste de branqueamento com MnP e definiram que o oxalato foi o quelante que deu melhor resultado. Todo o processo requereu a otimização da concentração de MnSO_4 e H_2O_2 , com resultado da ordem de 30 μM a 50 μM e 40 μM a 50 μM , respectivamente. A adição do peróxido de hidrogênio foi feita com pulsos de cinco minutos a partir da diluição de uma solução estoque de maior concentração. O branqueamento com enzima e peróxido produziu uma polpa com 83% de alvura, e no controle, sem enzima, a alvura foi bem menor (77%).

16.3.3 Uso de LiP

A enzima lignina peroxidase tem sido muito menos avaliada em estudos de biobranqueamento de polpas *kraft* do que as lacases e as MnPs. Isso se deve ao fato de a enzima LiP ser produzida por poucos micro-organismos e ser secretada somente em condições de cultivo bastante especiais, principalmente em decorrência da limitação de carbono ou nitrogênio nos meios de cultura¹. Em geral, os estudos de branqueamento realizados com LiP utilizaram extratos brutos de cultivo, ou seja, nestes extratos há outras enzimas. Esse fato dificulta muito o discernimento de quais são os agentes envolvidos no biobranqueamento. Um branqueamento enzimático de polpa *kraft* de eucalipto realizado com uma mistura de LiP, MnP e celobiose desidrogenase mostrou-se vantajoso para reduzir o número kappa em relação a um branqueamento ao controle utilizando apenas álcali⁴⁶. O uso de misturas de enzimas é uma condição bastante favorável para o branqueamento de polpas devido à ocorrência de um efeito sinérgico, conforme reportado por Antonopoulus et al.⁴⁷, para a mistura de peroxidases e xilanases. Esse preparado enzimático atuou em condição levemente alcalina (pH 7,6) e ocasionou uma redução de 2,8 pontos no número kappa de polpas, com kappa inicial de 11,7.

A produção de LiP em fermentadores é expressivamente menos eficiente do que lacase e MnP, e isso limita muito a aplicação dessa enzima em processos de biobranqueamento. De fato, a diferença de produtividade é da ordem de mil vezes menos para a LiP, visto que essa enzima é frequentemente produzida e expressa em unidades por litro (UI/L), enquanto os valores de atividades obtidos com lacases e MnPs são expressos em UI/mL.

16.4 PRINCÍPIOS BÁSICOS DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE POLPAS

16.4.1 Procedimento de recuperação de enzimas de cavacos de madeira biotratados

Micro-organismo, preparo do inóculo e biodegradação da madeira

Ceriporiopsis subvermispora deve ser mantido em ágar extrato de malte a 4 °C, e das placas retira-se 20 discos com diâmetro de 8 mm para inoculação em frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio à base de extrato de batata-dextrose (2,4%) e de extrato de levedura (0,7%). Após 12 dias

de incubação estática a 27 °C, o micélio obtido deve ser filtrado, lavado e macerado com água esterilizada.

Biorreatores de polietileno com capacidade de 20 L são preenchidos com 2 Kg de cavacos de eucalipto (massa seca) e mantidos imersos em água por um período de 12 horas. Após drenagem e esterilização a 121 °C por 15 minutos, os biorreatores podem ser inoculados com uma alíquota da suspensão de micélio obtida da maneira descrita no parágrafo anterior, de forma a se obter uma concentração inicial de micélio igual a 500 mg por quilo de madeira (massa seca), podendo ser suplementados ou não com conutrientes, glicose (0,5% m/m) e milhocina (0,5% m/m). Os biorreatores inoculados necessitam ser agitados para homogeneização de seu conteúdo e incubados a 27 °C por 28 dias, utilizando-se fluxo de ar igual a 23 L/h.

Preparo dos extratos enzimáticos

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, o conteúdo do biorreator (micélio e cavacos) é então transferido, em frações de 200 g, para frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL do tampão de extração (acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, adicionado de 0,01% de Tween 60) e mantido sob agitação de 120 rpm a 10 °C por um período de 4 horas. Os extratos enzimáticos assim obtidos passam pela etapa de centrifugação a 3.400 g por 15 minutos, para a remoção de materiais particulados.

Experimento de remoção de contaminantes e concentração das enzimas

A remoção de contaminantes é normalmente conduzida em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de extrato e 2% de carvão ativado sob agitação por 30 minutos, seguida de filtração em papel de filtro quantitativo.

Após a adsorção em carvão ativado, o pH dos extratos é ajustado para 4,8 com ácido acético 2 M, sendo posteriormente carregados em coluna (10,2 × 0,98 cm) empacotada com a resina DEAE Sepharose CL 6B. Previamente ao carregamento dos extratos, a coluna necessita ser equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), sendo as operações de carregamento, lavagem e eluição operadas a 0,50 a 0,75 mL/min. Para a lavagem da coluna, emprega-se um tampão de equilíbrio, e para a eluição, NaCl 0,2 M preparado no mesmo tampão.

Determinação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas, expressas em UI/Kg de madeira ou UI/mL de extrato, podem ser feitas utilizando as seguintes metodologias:

Para a atividade de lacases é feito o acompanhamento da oxidação de ABTS ($\epsilon_{420\text{nm}}$ igual a $36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura reacional contém 0,1 mL de ABTS 1 mM, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 75 mM (pH 5,0), 0,1 mL de água deionizada e 0,5 mL de extrato enzimático.

A atividade de manganês peroxidases é determinada acompanhando-se a oxidação de vermelho de fenol ($\epsilon_{610\text{nm}}$ igual a $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura reacional contém 1,75 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 3,2), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,5 mL de sulfato de manganês 1 mM, 0,25 mL de albumina bovina 1,8%, 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,25 mL de extrato enzimático. Após o início da reação, frações de 1 mL são retiradas do tubo contendo a mistura reacional a cada 1 minuto e transferidas para cubetas contendo 65 μL de hidróxido de sódio 6,5 M, previamente à leitura da absorbância.

A atividade de lignina peroxidases é determinada acompanhando-se a oxidação de Azure B. A mistura reacional contém 0,1 mL de Azure B 320 μM , 0,5 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,2 mL de extrato enzimático.

16.4.2 Tratamento enzimático de polpas celulósicas

Preparo da polpa

Para se obter uma boa eficiência no tratamento enzimático de polpas celulósicas é necessário que a matéria-prima tenha sido submetida a um pré-tratamento para que parte da lignina e hemicelulose seja removida, preservando ao máximo a celulose. Em geral, as polpas passam por tratamentos alcalinos ou ácidos visando alcançar esse objetivo. Dependendo da composição química da polpa é feita a escolha da(s) enzima(s) para o tratamento enzimático. Conhecendo-se as atividades das enzimas estudadas (Tabela 16.1), é possível calcular a carga enzimática que deve ser aplicada no tratamento. As condições operacionais de temperatura, pH e tempo vão depender das propriedades da enzima utilizada.

Condições de tratamento enzimático da polpa

O tratamento com o extrato enzimático é normalmente feito empregando duas unidades de atividade por grama de massa seca de polpa e 1,5 g de polpa (massa seca) na consistência de 10%. A consistência é determinada pela relação massa seca/massa úmida, sendo expressa em porcentagem (Equação 16.1). A polpa é pesada e é determinada a massa úmida. Para atingir a consistência desejada (10%), adiciona-se um volume de água e enzimas à massa seca. O pH da polpa deve ser ajustado de acordo com o experimento, trabalhando-se geralmente em pH entre 4 e 7 para enzimas derivadas de fungos, temperatura de 50 °C e tempo de 2 a 12 horas. A mistura de enzima e polpa é mantida em sacos de polietileno, vedados com seladora e devidamente incubados em banho com temperatura controlada.

(Equação 16.1)

$$\text{água adicionada (ml)} = \frac{\text{polpa (massa seca)} - \text{polpa (massa úmida)}}{\text{consistência}} - \text{enzima (mL)}$$

Após os tratamentos das polpas com o extrato contendo a atividade oxidativa, estas precisam ser submetidas a uma extração alcalina. Normalmente, utilizam-se 4% de NaOH, a 70 °C, durante 60 minutos. Depois dessa etapa são realizadas as análises das polpas, empregando no mínimo os testes de viscosidade e número kappa.

O número kappa representa o grau de deslignificação de uma polpa de celulose e é definido como o número de mililitros de uma solução de KMnO_4 0,1 N consumido por um grama de polpa seca. Os resultados são corrigidos para dar um consumo de 50% de KMnO_4 em contato com as amostras. As polpas, entre 0,30 g e 0,35 g (massa seca), são suspensas em 10 ml de água destilada e transferidas com 140 ml de água destilada para um Erlenmeyer de 300 ml, o qual necessita ser mantido a 25 °C sob agitação. Para polpas de celulose com baixos teores de lignina, com um número kappa entre 2,5 e 35, pipetam-se 25 mL de KMnO_4 0,1000 +/- 0,0005 N em um Erlenmeyer de 125 mL, e adicionam-se 25 mL de H_2SO_4 4,0 N. Essa solução é então misturada quantitativamente à polpa para reagir por 10 minutos, sendo a reação em seguida interrompida pela adição de 5,0 mL de KI 1,0 M. Todo o residual da solução de permanganato deve ser lavado com 50 mL de água destilada e vertido no frasco contendo a polpa. O iodo livre presente na suspensão é que vai ser titulado com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1000

+/- 0,0005 N até a solução ficar amarelo-clara. Em seguida, são adicionadas duas gotas de solução de amido, e a titulação é conduzida até a viragem da cor azul para a branca. Um controle sem a polpa deve ser preparado para que o volume de Na_2SO_3 consumido pelo branco seja usado na equação de determinação do número kappa (Equação 16.2).

$$\begin{aligned} \text{(Equação 16.2)} \quad n^\circ \text{ kappa} &= (P \times f)/w \times [1 + 0,013 (25 - T)] \\ P &= [(b-a)]/0,1 \quad f = 0,0084P + 0,895 \end{aligned}$$

em que P é o volume de KMnO_4 que reagiu (mL); a é o volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação da amostra (mL); b é o volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação do branco (mL); f é o fator de correção para um consumo de 50% de permanganato de potássio, determinado para cada P; N é a normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; T é a temperatura de análise ($^\circ\text{C}$); e w é a massa da polpa seca (g).

A viscosidade é determinada pesando exatamente 0,125 g em um frasco, seguido da adição de 25 mL de uma solução de etilenodiamina cúprica 0,5 M. Após agitação de 10 minutos com uma barra magnética a mistura é transferida para a pipeta de Fesnske-Oswald, previamente aferida com óleo padrão e usada dentro dos limites de viscosidade apropriados. O tempo de escoamento é cronometrado, podendo assim a viscosidade da polpa de celulose ser determinada de acordo com a Equação 16.3.

$$\text{(Equação 16.3)} \quad V \text{ (cp)} = k_v \times t \times d$$

em que V é a viscosidade da solução (cP); k_v é a constante do viscosímetro ($\text{cP.s}^{-1}.\text{g}^{-1}.\text{cm}^3$); t é o tempo de escoamento (s); d é a densidade da solução de celulose a $25^\circ\text{C} - 1,052 \text{ g.cm}^{-3}$

A eficiência de deslignificação e a seletividade do processo de branqueamento são determinadas através das seguintes relações:

$$\text{(Equação 16.4)}$$

$$\% \text{ Eficiência de deslignificação} = \frac{n^\circ \text{ kappa inicial} - n^\circ \text{ kappa final}}{n^\circ \text{ kappa inicial}}$$

$$\text{(Equação 16.5)} \quad \text{Seletividade} = \frac{\text{eficiência de deslignificação}}{\% \text{ de redução da viscosidade da polpa}}$$

As polpas tratadas com as enzimas de *C. subvermispota* em geral apresentam aumento da viscosidade em relação ao controle. O aumento da viscosidade é uma propriedade desejável, pois se relaciona com o grau de polimerização da celulose e, indiretamente, com a resistência do papel. O aumento da viscosidade após o branqueamento é observado pela ação enzimática nas xilanas e lignina da superfície das fibras, enriquecendo a polpa em celulose. Dessa forma, o grau de polimerização final da polpa é aumentado.

O número kappa das polpas é reduzido em até 10% após o tratamento com extratos quando se utiliza a carga de 2 UI/g de manganês peroxidase, com 3 horas de reação. A perda da lignina após o tratamento enzimático tem sido atribuída à redução dos complexos de lignina-carbohidrato. Ocorrem também mudanças morfológicas na superfície das fibras, como fendas, filamentos e desfibramento devido ao tratamento enzimático. Essas fendas facilitam a difusão das macromoléculas de lignina degradada da parede das fibras, proporcionando uma diminuição mais acentuada do número kappa das polpas branqueadas.

O extrato enzimático de *C. subvermispota* apresenta um efeito biobranqueador significativo e mostra-se bastante seletivo, em razão da composição de seu complexo enzimático compreender as lacases, as MnPs, o complexo xilanolítico completo e um pouco eficiente complexo celulolítico.

16.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Fungos de degradação branca são os principais decompositores dos materiais lignocelulósicos, e alguns deles podem ter um impacto importante na indústria que visa ao processamento de materiais lignocelulósicos. Alguns exemplos mostram que espécies dessa classe de fungos inoculadas sobre polpa celulósica não branqueada causam o aumento da alvura e a diminuição do número kappa dessa polpa⁴⁸. Outro exemplo importante da aplicação biotecnológica de fungos de degradação branca refere-se à biopolpação de cavacos de *Eucalyptus* com *C. subvermispota*. Os resultados mostram uma redução de até 40% no consumo de energia durante a polpação termomecânica²⁴. Mais recentemente, a combinação de um pré-tratamento biológico de palha de trigo com *Irpex lacteus* e *Poria subvermispota* seguido de uma extração alcalina aumentou significativamente a acessibilidade enzimática à celulose e a produção de etanol a partir da glicose formada³³.

Obviamente, o tratamento de materiais lignocelulósicos com fungos está muito distante dos propósitos industriais, por apresentarem longos tempos

de incubação e o inevitável consumo de polissacarídeos. Esse tem sido um problema que pode ser resolvido com o emprego direto das enzimas produzidas por esses fungos. Entretanto, o emprego de enzimas oxidativas nesses processos ainda está limitado à elevada demanda, mas esse aspecto não parece ser crítico, pois em curto espaço de tempo haverá a possibilidade da produção comercial dessas enzimas a partir de organismos recombinantes. Por exemplo, um trabalho não muito recente mostrou que é viável a secreção de MnP por uma levedura transformada geneticamente, que foi capaz de produzir níveis de MnP da ordem de 2,5 U/mL em cultivos submersos em fermentador⁴⁹. A enzima produzida foi parcialmente purificada e também se mostrou efetiva para a deslignificação de polpas *kraft*.

REFERÊNCIAS

1. Kirk TK, Cullen D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Young R, Akhtar M, editors. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley & Sons; 1998. p. 273-308.
2. Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro PJC, Brown K, Salbo R, Ding H, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*. 2010;49:3305-16.
3. Horn SJ, Vaaje-Kolstd G, Westereng B, Eijsink VG. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 2012;5:45.
4. Vries RP, Visser J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001;65:497-522.
5. Kuhad RC, Singh A, Eriksson KEL. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: Eriksson KEL, editor. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1997;57:45-126.
6. Martinez AT. Molecular biology and structure-function of lignin- degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30:425-44.
7. Kersten PJ, Kirk TK. Involvement of a new enzyme, glyoxaloxidase, in Extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*. 1987;169:2195-201.
8. Schwarze FWMR. Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*. 2007;21:133-70.
9. Sethuraman A, Akin DE, Eriksson K-EL. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 1998;27:37-47.
10. Fernandez-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, et al. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispota* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109:5458-63.
11. Souza-Cruz PB, Freer J, Siika-Aho M, Ferraz A. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of Pinus taeda wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004;34:228-34.
12. Vicentim MP, Ferraz A. Enzyme production and chemical alterations of Eucalyptus grandis wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispota* cultures supplemented with Mn²⁺, corn steep liquor and glucose. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40:645-52.

13. Heidorne FO, Magalhães PO, Ferraz A, Milagres AMF. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;38:436-42.
14. Hofrichter M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30:454-66.
15. Urzúa U, Larrondo LF, Lobos S, Larraín J, Vicuña R. Oxidation reaction catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispota*. *FEBS Letters*. 1995;371:132-6.
16. Carvalho W, Ferraz A, Milagres AMF. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispota*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;43:193-8.
17. Carvalho W, Ferraz A, Milagres AMF. Uso de carvão ativado e resina de troca iônica para limpeza e concentração de enzimas em extratos de madeira biodegradada. *Acta Scientiarum Technology*. 2010;32:347-54.
18. Domingos M, Silva JM, Prata AMR, Ferraz A, inventors. Biorreator com sistema de agitação e aeração específico para cultivo de células aderentes e/ou sensíveis ao cisalhamento. Patente brasileira. PI 1003119-7A2; 2010.
19. Mendonça R, Guerra A, Ferraz A. Delignification of *Pinustaeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispota* for preparing high-yield kraft pulps. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2002;77:411-8.
20. Leatham GF, Forrester IT, Mishra C. Enzymes from solid substrates recovering extracellular degradative enzymes from *Lentinula edodes* cultures grown on commercial wood medium. Leatham GL, Himmel, ME, editors. *Enzymes in Biomass Conversion*, ACS Symposium Series. 1991;8:95-110.
21. Silva EM, Martins SF, Milagres AMF. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. *Bioresource Technology*. 2008;99:2471-5.
22. Dawson-Andoh BE, Morrell JJ. Extraction of proteins from wood wafers colonized by decay fungi. *Holzforschung* 1992;46:117-20.
23. Arantes V, Silva EM, Milagres AMF. Optimal recovery process conditions for manganese-peroxidase obtained by solid-state fermentation of eucalyptus residue using *Lentinula edodes*. *Biomass and Bioenergy*. 2011;35:4040-4.
24. Ferraz A, Guerra A, Mendonça R, Masarin F, Vicentim MP, Aguiar A, Pavan PC. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;43:178-85.
25. Parajó JC, Dominguez H, Dominguez JM. Biotechnological production of xylitol: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*. 1998;66:25-40.

26. Rubia T, Linares A, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Romera J, Martínez J. Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavidolorata*. *Research in Microbiology*. 2002;153:547-54.
27. Lobos S, Larraín J, Salas L, Cullen D, Vicuña R. Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. *Microbiology*. 1994;140:2691-8.
28. Santos HB. Estudo da recuperação das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis subvermispota* em cavacos de eucalipto extraídos com água ou etanol [Dissertação de Mestrado]. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo; 2008. 116f.
29. Magalhães PO. Purificação de hemicelulases e de uma B-glicosidase de *Ceriporiopsis subvermispota* produzidas em condições de biopólpação. [Tese de Doutorado]. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo; 2005. 133f.
30. Alfenas AC, Peters I, Brune W, Passador GC. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa; 1991. 242 p.
31. Ragnar M, Lindgren CT, Nilvebrant NO. pK_a -values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 2000;20:277-305.
32. Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Del Río JC, Gutiérrez A. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion Biotechnology*. 2009;20:348-57.
33. Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez AT, Martínez MJ. Fungal pretreatment. An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*. 2011;102:7500-6.
34. Ferraz A, Córdova AM, Machuca A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32:59-65.
35. Christov LP, Prior BA. Bleaching response of sulfite pulps to pretreatment with xylanases. *Biotechnology Progress*. 1997;13:695-8.
36. Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI. Blue Laccases. *Biochemistry* 2007;72:1136-50.
37. Eggert C, Temp U, Eriksson KE. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:1151-8.
38. Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:1775-84.
39. Bourbonnais R, Paice MG. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. 1990;267:99-102.

40. Call HP, Mucke I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology*. 1997;53:163-202.
41. Couto SR, Toca-Herrera JL. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 2007;25:558-69.
42. Ibarra D, Camarero S, Romero J, Martínez MJ, Martínez AT. Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2006;81:1159-65.
43. Camarero S, Ibarra D, Martínez AT, Romero J, Gutierrez A, del Río JC. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40:1264-71.
44. Sasaki T, Kajino T, Li B, Sugiyama H, Takahashi H. New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67:2208-12.
45. Feijoo G, Moreira MT, Álvarez P, Lu-Chau TA, Lema JM. Evaluation of the enzyme manganese peroxidase in an industrial sequence for the lignin oxidation and bleaching of eucalyptus kraftpulp. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008;109:1319-27.
46. Fang J, Huang F, Gao P. Optimization of cellobiose dehydrogenase production by *Schizophyllum commune* and effect of the enzyme on kraft pulp bleaching by ligninases. *Process Biochemistry*. 1999;34:957-61.
47. Antonopoulou VT, Hernandez M, Arias ME, Mavrakos E, Ball AS. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2001;57:92-9.
48. Reid ID. Bleaching Kraft Pulps with White-Rot Fungi. In: Young RA, Aktar M, editors. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. New York: J. Wiley; 1998. 577p.

GENÉTICA PARA MELHORAMENTO DE PLANTAS

REGULAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DE RESPOSTAS AO ESTRESSE EM POPULAÇÕES NATURAIS DE PLANTAS

Railson Schreinert dos Santos
Cesar Valmor Rombaldi
Antonio Costa de Oliveira

17.1 INTRODUÇÃO

Embora sob uma ótica linear existam estudos que demonstrem que a insegurança alimentar é resultado da dificuldade de acesso a alimentos numa perspectiva de ação política, uma avaliação mais global também inclui interferentes científico-tecnológicos, com desafios para a produção, a diminuição de perdas, a distribuição e o comércio justo. É fato inequívoco que a população mundial e a demanda por alimentos aumenta e, junto com elas, os problemas de limitação de expansão de áreas, bem como de recursos naturais. Assim, em plena ação corroborativa com as políticas nacionais e internacionais de redução de discrepâncias econômico-sociais, há que se responder à pergunta: como aumentar a produção de alimentos sem utilizar áreas impróprias e/ou comprometer os recursos naturais num contexto de mudanças

climáticas globais? A prospecção e a obtenção de plantas adaptadas a condições ambientais adversas, com potencial agrônomo para a produção de alimentos com propriedades nutricionais e funcionais diferenciadas é relevante, importante e inadiável. No processo de evolução, as plantas desenvolveram formas de responder e tolerar condições ambientais adversas, mas, para que se possa utilizar e/ou potencializar esses eventos evolutivos na produção de alimentos, combustíveis, vestuário, paisagens e reestabelecimento de biomas fortemente alterados, é necessária uma maior compreensão dos mecanismos genético-moleculares que coordenam a recepção e transdução de sinais e, por conseguinte, regulam vias metabólicas gerenciadoras do próprio genoma e aquelas do metabolismo primário e secundário das plantas. Grande parte dessas respostas se deve a dois tipos de regulação gênica: genética e epigenética. É nesse contexto que este capítulo está inserido, buscando responder às perguntas da atualidade na temática. O que se sabe sobre esses eventos? Como podemos acessar essas informações? Como elas podem contribuir para a evolução da produção agropecuária? Quais são os mecanismos envolvidos? Quais as técnicas mais empregadas na atualidade para abordar essa temática? Com essa abordagem, espera-se poder disponibilizar base conceitual, exemplos e aplicabilidade científica e tecnológica.

17.2 EVOLUÇÃO E ESTRESSE (POR QUE É IMPORTANTE ESTUDAR ESTRESSES AMBIENTAIS?)

Prospecções apontam para o aumento populacional mundial, prevendo-se aproximadamente 10 bilhões de pessoas no planeta Terra no ano de 2080. Isso significa que a produção de alimentos precisará crescer 0,4% ao ano. Indicadores ainda apontam para um aumento do poder aquisitivo em regiões em situação econômica mais vulnerável. Tudo isso levará a um aumento da demanda quantitativa e qualitativa de alimentos. Assim, os desafios relacionados à segurança alimentar mundial passam, sem dúvida, por ações de política socioeconômica, mas dependem fortemente do viés científico-tecnológico, que significa mais alimentos em menos área, com mais qualidade nutricional e funcional e na mesma base de produção.

Terras e recursos hídricos já são fortalezas limitadas na atualidade, tanto em termos quantitativos (*per capita*) quanto qualitativos. Além disso, a degradação dos solos, a salinização de áreas irrigadas, a urbanização, a utilização de grandes áreas para outros fins que não a produção de alimentos, as mudanças de regimes de temperatura e precipitações, bem como da

incidência de radiação, constituem-se em desafios reais para a produção agrícola e pecuária¹.

Apesar dessa perspectiva desafiadora e difícil, o histórico recente demonstra que, se há um problema real em potencial, medidas preventivas e, às vezes, ações corretivas devem ser tomadas. O Brasil, por exemplo, triplicou sua produção agrícola em três décadas, tendo aumentado em 80% a área cultivada. Isso indica que, apesar de ter avançado na fronteira agrícola, e em alguns casos de forma desordenada, exploratória e destruidora, também evoluiu em um dos principais indicadores da atividade: produtividade técnica. Porém, é sabido que não basta aumentar a produtividade (Kg.ha^{-1}): é preciso monitorar e evoluir para a redução do aporte de insumos, melhorar a produtividade econômica, diminuir a dependência de insumos protegidos e, sobretudo, gerar alimentos seguros, com diferencial nutricional e funcional, com proteção do ambiente e dos trabalhadores, valorizando o território.

Frente ao exposto, é necessário buscar alternativas para o aumento da produtividade técnica, embutindo todos os conceitos mencionados. Para isso, a ação mais aplicável, e de imediato, é aumentar o acesso à informação e ao conhecimento. Mesmo com os avanços ocorridos, ainda há dificuldades para transformar o conhecimento científico em produto tecnológico, promotor de desenvolvimento continuado. Outra importante estratégia de ação é o incentivo ao melhoramento genético de plantas, seja na adaptação de cultivares às condições locais e/ou na prospecção de novos genótipos na geração de novos materiais mais tolerantes e produtivos frente a fatores ambientais, bióticos ou abióticos, adversos².

Um grande número de fatores bióticos e abióticos tem impacto na produção e na produtividade agrícola. Os estresses bióticos são aqueles causados por outros organismos vivos, como bactérias, vírus, fungos, insetos-praga, plantas concorrentes cultivadas ou nativas. Já, os estresses abióticos são aqueles causados por agentes não vivos, como, falta ou excesso de água, salinidade, toxicidade causada por cátions ou ânions, ventos, temperaturas extremas, secas, inundações, radiações e até desastres naturais, como tornados e incêndios florestais. No contexto histórico da pesquisa agropecuária nacional e internacional, as ações majoritárias adotadas foram centradas em estratégias que buscassem mitigar esses estresses, ou propor recursos que pudessem amenizar os efeitos causados por esses agentes estressores. Como resultado, a produção agrícola e pecuária internacional aumentou e, apesar dos desafios, há condições de se produzir o necessário para o abastecimento atual. Contudo, como os indicadores apontam para incrementos de consumo, é necessário buscar estratégias que consolidem o conhecimento

já existente, assim como buscar novos vieses de pesquisa e desenvolvimento. Um deles visa, em vez de se contrapor aos fatores bióticos ou abióticos ameaçadores da produtividade técnica, valorizá-los como aliados da produção e da qualidade.

De certa forma, nos biomas em que as espécies coevoluem, já há um processo de melhoramento resultante do acúmulo de mutações seguido por seleção natural. Como resultado da evolução, há espécies adaptadas a condições ambientais adversas, sendo capazes de responder a diferentes estresses e garantindo a adequada reprodução e continuidade da espécie. É claro que, para a maioria dos casos, a produtividade técnica ainda é baixa, e muitas vezes elas produzem frutos ou grãos com teores elevados de fatores antinutricionais, de alcaloides e, até mesmo, moléculas alergênicas para os seres animais. De toda maneira, essas bases genéticas e o conhecimento de como essas plantas se adaptam, crescem, desenvolvem-se e se reproduzem nesses ambientes e condições constituem-se no referencial científico que deverá embasar o melhoramento genético assistido de plantas, associando ferramentas de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica.

A teoria da seleção natural, introduzida por Charles Robert Darwin (1809-1882) em seu livro *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*, ou *The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*, de 1859, superou a “teoria lamarquista”, proposta pelo biólogo francês Jean-Baptiste Pierre Antoine de Monet, Chevalier de Lamarck (1744-1829), no livro *Philosophie zoologique ou exposition des considérations relatives à l’histoire naturelle des animaux*. Lamarck, como é mais conhecido, propunha que o ambiente causava mudanças nas necessidades dos organismos e, conseqüentemente, mudariam seu comportamento/características. Assim, o “lamarquismo” baseava-se nas chamadas leis do “uso e desuso” e de “transmissão dos caracteres adquiridos”.

A formulação e apresentação das leis da hereditariedade (leis de Mendel), que regem a transmissão dos caracteres hereditários, por Gregor Mendel (1822-1884), em 1865, seguida de avanços posteriores em estudos de genética, praticamente suplantaram as ideias lamarquistas, que só voltaram a ser discutidas mais atualmente. Na atualidade, a seleção natural é a única causa reconhecida de adaptação, mas não a única causa da evolução, que inclui eventos não necessariamente adaptativos como a mutação e também a deriva genética³. Um resumo das contribuições de Lamarck, Darwin e Mendel é apresentado na Figura 17.1.

Chama-se de deriva genética a mudança na frequência de um alelo em uma população devido à amostragem aleatória. É um processo importante,

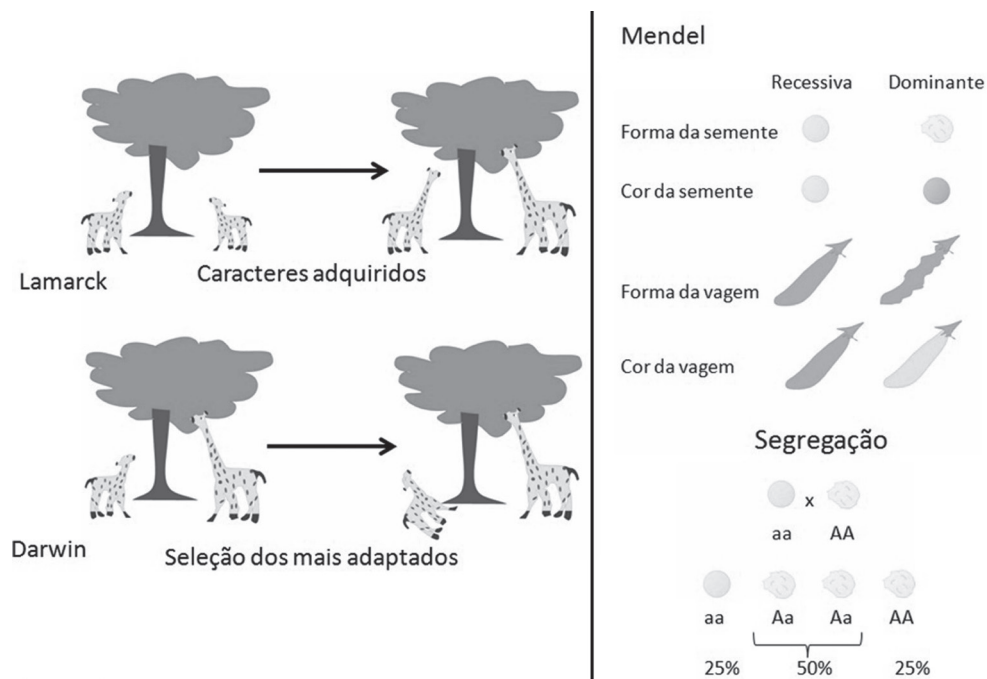


Figura 17.1 Teorias propostas por Lamarck e Darwin, à esquerda. Segregação dos caracteres proposta por Mendel, à direita.

que influi na evolução de organismos, em especial em populações pequenas. Há referencial teórico qualificado sobre o assunto⁴, mas, neste capítulo, somente as mutações serão mais detalhadas.

Mutações são alterações na sequência de nucleotídeos de um fragmento de ácido nucleico chamado selvagem (*wild-type*). Tais mutações são consequências de “erros” na recombinação do material genético, replicação do ácido desoxirribunucleico (DNA), fruto da ação de agentes exógenos bióticos ou abióticos, e até mesmo da ativação de sequências autopropagativas, como os elementos transponíveis descobertos por Barbara McClintock (1950) em milho, e que depois se mostraram presentes nos mais diversos genomas. As mutações podem não resultar em respostas fisiológicas, alterar o produto de um gene ou impedir o seu funcionamento. Elas podem ainda envolver grandes regiões de um cromossomo, tornando-se repetidas, caso em que geralmente ocorrem por erros na recombinação genética, podendo introduzir cópias de genes no genoma⁵. As cópias extras são fonte de matéria-prima para a criação de novos genes com novas funções, um fenômeno chamado de neofuncionalização⁶. Isso é importante porque a maioria dos

genes evolui dentro de famílias, partilhando um ancestral comum⁷, incluindo genes que direcionam modificações epigenéticas, como será detalhado na sequência. Essa duplicação de genes pode fazer com que a nova cópia situe-se em outras regiões do genoma, estando, assim, sujeita a elementos regulatórios diferentes.

Os efeitos das mutações podem ser classificados em três categorias. Há mutações que podem ser prejudiciais ao organismo dentro do ambiente em questão (prejudica o *fitness*); há mutações “neutras”, que têm pouco ou nenhum efeito sobre o *fitness*; e, há aquelas mutações vantajosas (raras), que aumentam o *fitness*, contribuindo com a adaptação do organismo⁸. As mutações com *fitness* aumentado tendem a ser selecionadas e passar às gerações seguintes. Assim, embora sempre submetida ao teste de hipótese, compreende-se melhor o processo de evolução do que na época de Darwin, no século XIX. Entretanto, como veremos, muito ainda vem sendo descoberto, e tais conhecimentos são de suma importância não só para o melhoramento genético de plantas, mas também para muitas outras áreas, incluindo o tratamento e cura de muitas doenças.

17.3 O QUE É REGULAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA?

Para ter efeito, um gene precisa ser transcrito e, muitas vezes, traduzido (gerar uma proteína), e essa proteína atuar em algum evento bioquímico-fisiológico. Como foi citado anteriormente, o conceito de mutação ainda é bastante vago: “uma mudança na sequência de nucleotídeos”. As mutações podem gerar novas cópias de genes, indiretamente mudar a sequência de aminoácidos de uma proteína e sua função, bem como modificar o entorno desse gene. Assim, mudanças na sequência de aminoácidos de proteínas representam apenas uma das consequências da mutação, mas as sequências nucleicas têm papel mais complexo do que somente codificar polipeptídeos.

A regulação transcricional, que determina quando e quanto de um gene será transcrito, é resultado de ações de uma grande variedade de fatores, tais como a atividade de fatores de transcrição, remodeladores da cromatina, polimerases, helicases, topoisomerases, quinases, proteasomas, acetiltransferases, desacetilases e metiltransferases⁹. Todos esses fatores, os quais também estiveram sofrendo modificações e seleção ao longo do tempo, executam suas ações com precisão e exatidão em resposta às mudanças nas diferentes fases de desenvolvimento do organismo, bem como em resposta às influências do meio externo.

Dentro da regulação transcricional, uma das áreas que tem se popularizado bastante é a epigenética. Literalmente, “epigenética” significa “no topo” (o prefixo “epi” significa “posição superior”, em grego) da genética. O britânico Conrad Hal Waddington (1905-1975) foi o primeiro cientista a falar e formalizar afirmativas e hipóteses em epigenética, então chamada “paisagem epigenética” (*epigenetic landscape*), em 1940, no livro *Organisers & Genes*. A “paisagem epigenética” era uma metáfora para descrever como a regulação gênica modula o desenvolvimento dos organismos¹⁰. Waddington referia-se à epigenética como sendo o estudo de “como os genes e seus produtos fazem o fenótipo ser o que ele é”. Pouco se sabia sobre epigenética, mas, desde então, muito se avançou nesse campo, modificando-se a conceituação.

Na atualidade, a epigenética geralmente é conceituada como sendo o conjunto de modificações que ocorrem na sequência de DNA e na cromatina, que são estáveis ao longo de diversas divisões celulares, mesmo não envolvendo mudanças na sequência de nucleotídeos do organismo¹¹. A epigenética tem papel importante no processo de diferenciação celular, permitindo que as células mantenham características diferentes e estáveis, apesar de terem o mesmo material genético.

Alguns exemplos de modificações epigenéticas incluem o silenciamento de muitos genes, o *imprinting* genômico, a permutação, o fenômeno de *bookmarking*, a inativação do cromossomo X, o efeito de posição dos genes no cromossomo, reprogramação celular, efeitos paternos, modificações de histonas e formação de heterocromatina, entre outros. O envolvimento da epigenética em doenças como o câncer impulsiona os estudos e um consequente aumento de conhecimento nessa área, especialmente em mamíferos. No caso do câncer, sabe-se que, até hoje, todos os tipos analisados apresentam anomalias epigenéticas, as quais parecem serem necessárias e suficientes para o início e progressão da doença.

O termo “herança epigenética” refere-se à transmissão de experiências ocorridas com os pais para os filhos através de modificações epigenéticas. Isso ocorre porque, em alguns genes, marcas epigenéticas são mantidas e passadas de uma geração para a geração seguinte sem que haja o apagamento do epigenoma de forma completa na formação do novo organismo, como descrito pelos conceitos tradicionais¹¹, o que retoma ideias lamarquistas. A epigenética já foi relacionada a diferentes eventos, como problemas em filhos de pessoas afetadas pela fome na Segunda Guerra Mundial¹², e até às modificações morfológicas sofridas pela abelha-rainha, que tem uma dieta diferente das demais, causando modificações no seu epigenoma¹³.

Atualmente, a importância dada à epigenética deve-se ao seu significado prático para a medicina, agricultura, conservação de espécies e também à maneira pela qual ela modifica nossa visão de hereditariedade e evolução. Em particular, fortalece o reconhecimento de que existem sistemas de herança epigenética através dos quais variações não advindas da sequência de DNA podem ser transmitidas por gerações, ampliando o conceito de hereditariedade e desafiando outros conceitos dogmáticos e amplamente aceitos.

Além da regulação transcricional, a atividade gênica depende ainda de eventos posteriores, que podem ocorrer tanto na molécula de ácido ribonucleio (RNA), como na proteína já formada. Esses eventos regulam a atividade gênica pós-transcricionalmente e pós-traducionalmente. Essa regulação tem grande impacto no fenótipo do organismo, permitindo a adaptação vegetal a diferentes situações, constituindo um importante campo de estudo.

17.4 REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E ESTRESSE

A atividade transcricional e sua regulação são de extrema importância para a vida celular. Prova disso é que inibidores da transcrição podem ser usados como antibióticos contra bactérias e fungos. Bons exemplos são a rifampicina, que inibe a RNA polimerase dependente de DNA, e a 8-hidroxiquinolina, um inibidor de transcrição antifúngico. A regulação transcricional funciona de forma bem diferente quando se comparam organismos procariotos e eucariotos.

Em procariotos, a presença de determinados nutrientes no meio determina quais genes serão expressos. Nesses seres uma combinação de ativadores e repressores e intensificadores (*enhancers*) determina a transcrição gênica¹⁴. Já em eucariotos, a regulação transcricional é fruto de diversas interações entre proteínas e DNA, de forma bem mais complexa que em procariotos⁹. Pode-se afirmar que a regulação transcricional inclui a epigenética e, em grande parte, depende dela. Muitos dos mecanismos de regulação transcricional serão vistos na seção dedicada à epigenética, pois, apesar de muitas vezes não se encaixarem no conceito de epigenética mais aceito (modificações herdáveis), é assim que são tratados pela maior parte da literatura disponível, devido, em grande parte, à íntima relação existente entre tais mecanismos (herdáveis e não diretamente herdáveis).

Antes de se abordar a regulação epigenética, é importante destacar que, em eucariotos, a regulação da transcrição tende a envolver interações combinatórias entre diversos elementos, o que permite uma resposta sofisticada

para várias condições ambientais, bem como diferenças espaciais e temporais na expressão gênica.

17.4.1 Alguns fatores importantes na regulação transcrricional

Apesar de serem elementos clássicos em procariotos, os eucariotos também fazem uso de intensificadores (Figura 17.2), os quais são pequenas regiões do DNA que podem ser ligadas às proteínas (fatores *trans*-atuantes, bem como um conjunto de fatores de transcrição) para aumentar os níveis de transcrição de determinados genes. Apesar dos intensificadores serem geralmente de atuação em *cis*, eles não precisam estar particularmente próximos dos genes em que atuam e, por vezes, não necessitam estar localizados no mesmo cromossomo¹⁵. Já os promotores são regiões de DNA de tamanho bastante variável que iniciam a transcrição de um determinado gene. Os

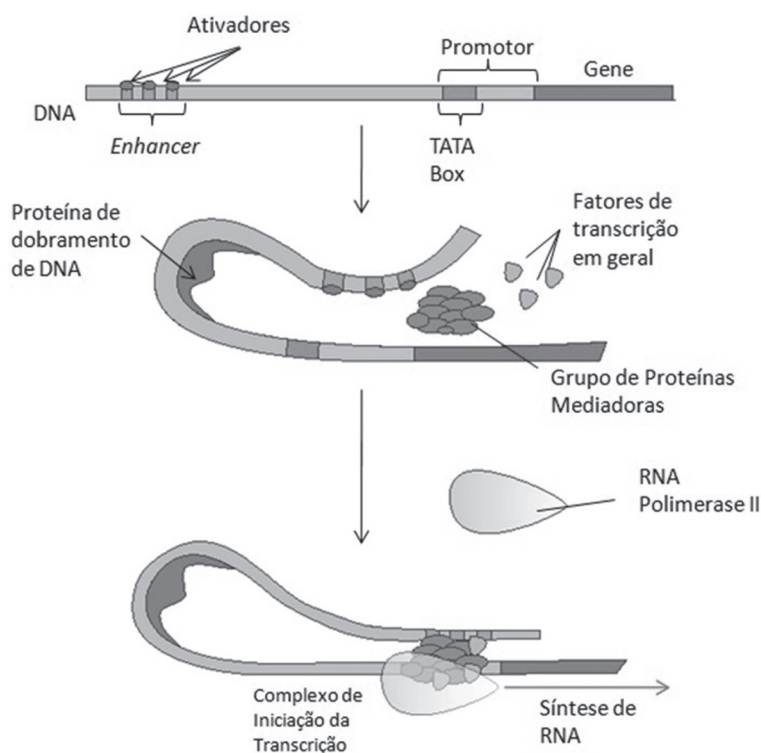


Figura 17.2 Forma de ação do intensificador (*enhancer*) na transcrição. Maiores detalhes podem ser encontrados no texto.

promotores estão localizados na região adjacente àquela que transcrevem, na mesma fita e a montante do gene. Outras sequências, como os íntrons, pedaços de pré-RNA mensageiro (pré-mRNA) removidos por *splicing*, também podem afetar a expressão gênica em plantas e outros eucariotos de diversas formas¹⁶. Obviamente, quando se faz referência a esses conceitos, fala-se do genoma nuclear eucarioto, pois os genomas mitocondrial e cloroplástico dos vegetais seguem uma lógica procariota.

Os fatores de transcrição (Figura 17.3A) são proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA, controlando a transcrição¹⁷. Os fatores de transcrição podem executar tarefas isoladamente ou através da formação de complexos com outras proteínas, promovendo, assim, a ativação ou o bloqueio do recrutamento da RNA polimerase para genes específicos¹⁸. Tais fatores geralmente encontram-se junto às chamadas fábricas de transcrição (*transcription factories* – Figura 17.3B), que são regiões eucromáticas de atividade transcricional intensa. Parece existir certa preferência para

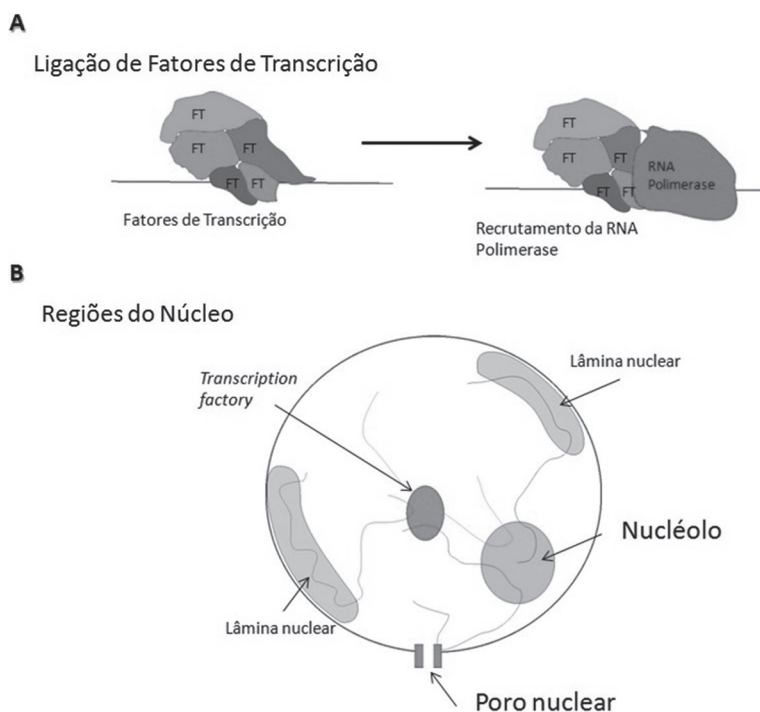


Figura 17.3 A) Ligação de fatores de transcrição à região promotora de genes com o recrutamento da RNA polimerase. B) Diferentes regiões do núcleo.

a associação de uma dada fábrica de transcrição a genes regulados pelo mesmo conjunto de fatores de transcrição¹⁹.

O primeiro fato que chamou a atenção para o papel dos fatores de transcrição na regulação gênica foi a sua importância ao longo do desenvolvimento das plantas²⁰. Nesses organismos, a primeira ideia de como o desenvolvimento é controlado por “interruptores” veio no início dos anos 1990, quando genes regulatórios importantes, que controlam a transição do crescimento vegetativo para reprodutivo, foram identificados em *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus*. Esses genes codificam fatores de transcrição que determinam a identidade dos meristemas florais e órgãos. Estudos subsequentes demonstraram uma complexidade muito grande na forma como a regulação é realizada^{21,22}.

Além da relação dos fatores de transcrição com o desenvolvimento vegetal, muitos estudos também passaram a relacionar mudanças transcricionais de genes de plantas, seres humanos, entre outros, como forma de resposta a diferentes estresses²⁴⁻²⁶. Tais estudos continuam sendo realizados, aumentando as informações disponíveis sobre as formas pelas quais os genomas são regulados frente a estímulos ambientais.

Recentes análises em larga escala de sítios de ligação de fatores de transcrição ao DNA *in vivo*, utilizando técnicas de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), tais como ChIP-seq e ChIP-chip²³, têm sido poderosas ferramentas para identificar possíveis genes-alvo.

Para a realização dos estudos de expressão transcricional, diferentes técnicas são utilizadas: *Nuclear run-on assay*²⁷, *RNase protection assay*²⁸, *ChIP-on-Chip* de RNA polimerase (RNAP)²⁹, microarranjo³⁰, *MS2-tagged RNA affinity purification* (MS2-TRAP)³¹, hibridização *in situ*³², *Northern blot*³³, *RNaseq*³⁴, reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real^{**35}.

17.5 REGULAÇÃO EPIGENÉTICA E ESTRESSE

A epigenética tornou-se uma das mais populares áreas de pesquisa na genômica funcional, propondo respostas para o entendimento do potencial de adaptação das plantas e de outros organismos. A variação epigenética pode, ou não, estar ligada à variação genética, assim como pode ser influenciada pelo ambiente em um mecanismo no qual este pode modelar o material hereditário^{36,37}. As formas de modificação epigenética da expressão gênica

* Mais informações sobre tais técnicas podem ser encontradas em outros capítulos dos volumes I, II e III desta obra, bem como nas referências aqui citadas.

variam entre as espécies, sendo que o foco neste capítulo serão as modificações que ocorrem em genomas vegetais. É importante destacar, ainda, que diferentes modificações epigenéticas estão descritas em plantas e estas são específicas de acordo com o tecido, espécie e idade do vegetal³⁸.

Sabendo-se dos efeitos das modificações epigenéticas sobre os vegetais fica evidente a importância do entendimento desses processos para o melhoramento genético visando tolerância/adaptação a estresses³⁹. Diferentes alterações epigenéticas existem, sendo que as mais estudadas atualmente são a metilação do DNA, modificações nas histonas e as provocadas por pequenos RNAs.

17.5.1 Metilação do DNA

A metilação de citosinas consiste em uma modificação covalente catalisada por uma enzima que transfere um grupo metil da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina, que passará a se chamar 5-metilcitosina (5mC). Plantas possuem níveis de 5mC relativamente altos, variando de 6% a 25% do total de citosinas, dependendo da espécie⁴⁰.

Nas plantas, diferentemente do que ocorre em mamíferos, a metilação de citosinas ocorre em três contextos: CpG, CpNpG e CpNpN, em que N significa A, C, ou T. Devido à sua natureza simétrica, a metilação CpG e CpNpG pode ser copiada na replicação do DNA, a partir do DNA hemimetilado (molécula de DNA em que somente uma das fitas, fita original ou paterna, se encontra metilada, logo após o evento de replicação). Entretanto, a metilação CpNpN, que é assimétrica, tem que ser restabelecida a cada replicação⁴¹.

As enzimas que participam da metilação do DNA vegetal são agrupadas em três categorias: metiltransferase (MET1), cromometilase3 (CMT3) e as chamadas metilases de domínios rearranjados (*momains rearranged methylases* – DRM). A MET1 é um homólogo da DNMT1 – DNA (citosina-5-)metiltransferase 1 – de mamíferos, predominantemente envolvida na manutenção de metilação CpG. A CMT3 é uma enzima específica de plantas que metila sequências CpNpG, especialmente em repetições centroméricas e transposons^{42,43}. Alguns trabalhos relatam uma redundância na atividade da CMT3 e MET1 em sítios CpNpG⁴⁴. As metiltransferases DRM1 e DRM2, por sua vez, parecem catalisar a metilação *de novo* em sequências assimétricas CpNpN⁴⁵, considerando-se que as DRMs têm capacidade de metilar qualquer citosina, independentemente do contexto⁴⁶.

A desmetilação pode ocorrer de duas formas: passiva e ativa (Figura 17.4). A passiva ocorre devido à inibição da metilação *de novo* ou à falta de capacidade de manter o chamado *imprinting* paterno após a replicação⁴⁷. A desmetilação ativa ocorre através da ação de glicosilases, as quais removem a metilação⁴⁸. A desmetilação ativa pode ser importante em prevenir a formação de epialelos hipermetilados no genoma vegetal⁴⁹, e a desmetilação de DNA alvo dirigida tem sido tema de estudos relevantes envolvendo o câncer⁵⁰. A desmetilação do DNA não é completamente compreendida e atualmente tem se mostrado bastante complexa, com diferentes consequências bioquímicas e moleculares para o organismo como um todo⁵¹.

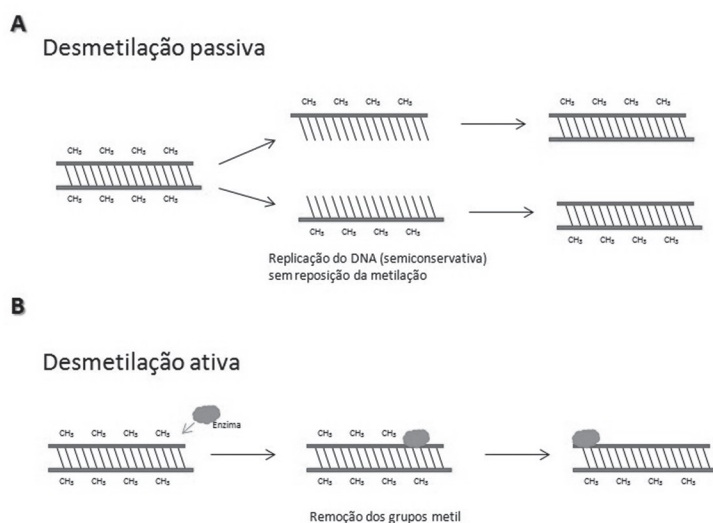


Figura 17.4 As duas formas de desmetilação possíveis. (A) A perda após a replicação do DNA e divisão celular sem reposição desta. (B) A remoção dos grupos metil por meio da ação de enzimas (glicosilases).

No arroz, a metilação CpG é característica de regiões gênicas, enquanto a metilação não CpG é abundante em elementos transponíveis⁵². A metilação na porção 5' do gene (promotor e parte da região transcrita) e na porção 3' (incluindo parte da região transcrita e sequências flangeadoras 3') geralmente inibe a expressão gênica⁵³⁻⁵⁵ (Figura 17.5). A relação da metilação com a inibição da expressão gênica e outras modificações ocorrentes na cromatina é um dos principais temas de estudo em epigenética atualmente. Outro tipo de modificação que vem emergindo como sendo de importância

para a regulação gênica é a chamada hidroximetilação, a qual é semelhante à metilação, mas que, em vez de inserir um grupo metil, insere um grupo hidroximetil no carbono 5 das citosinas (formando as chamadas 5-hidroximetilcitosinas – 5hmCs), como pode ser visto na Figura 17.6. A hidroximetilação tem suas peculiaridades o que torna importante a sua distinção da metilação comum através do uso de métodos de identificação apropriados.

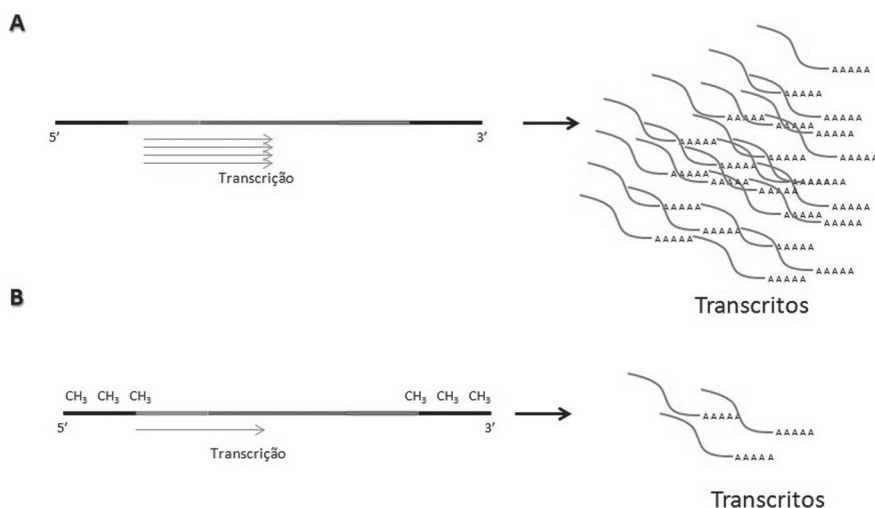


Figura 17.5 Consequência da metilação das regiões 5' e 3' dos genes, incluindo parte da região transcrita. (A) DNA não metilado com alto nível de transcritos. (B) DNA com regiões flaqueadoras e parte da região transcrita metilada e consequente menor nível de transcritos.

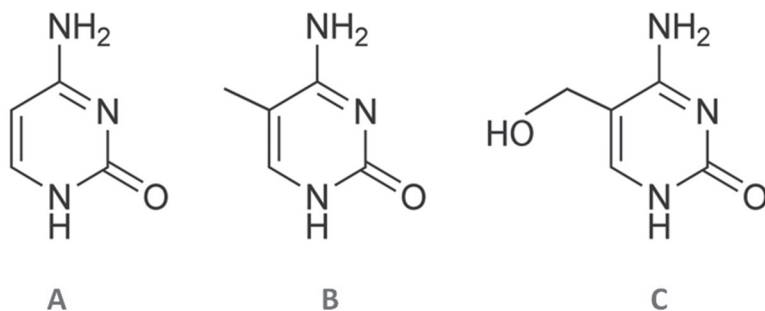


Figura 17.6 Moléculas de (A) citosina; (B) metilcitosina; (C) hidroximetilcitosina.

17.5.2 Modificações de histonas

As histonas estão sujeitas a uma grande variedade de modificações pós-traducionais, incluindo acetilação de lisinas, metilação de lisinas e argininas, fosforilação de serinas e treoninas, e ubiquitinação e sumoilação de lisinas⁵⁶, sendo que tais modificações ocorrem principalmente nas caudas N-terminais⁵⁷. Modificações covalentes na extremidade N-terminal das histonas afetam a posição e a compactação dos nucleossomos, tendo papel importante no remodelamento da cromatina e regulação gênica^{58,59}. Os processos de modificação pós-traducional de histonas mais comumente tratados em epigenética são a acetilação e a metilação de resíduos N-terminais, as quais têm impacto profundo no remodelamento da cromatina e, consequentemente, na atividade transcricional.

A metilação de lisinas é capaz de ativar ou reprimir genes, dependendo da sua localização. Os resíduos de lisina podem ser mono, di ou trimetilados, sendo que cada estado distinto confere diferentes significados biológicos. Por exemplo, H3K9me2 (que significa histona H3 dimetil Lis9, ou seja, uma dimetilação da lisina 9 da histona H3), H3K9me3, H3K27me3 e H4K20me3 reprimem a expressão, enquanto H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K36me2 e H3K36me3 ativam a expressão de genes próximos. A metilação de histonas pode ser revertida por enzimas desmetiladoras⁶⁰. A H3K9me2 é mais comum em regiões de repetições heterocromáticas, enquanto H3K9me3 e H3K27me3 estão distribuídas em regiões gênicas^{61,62}.

A acetilação e a desacetilação de histonas parecem ser processos-chave para repressão e ativação da expressão gênica pela modificação da cromatina⁶³. A acetilação remove parte da carga positiva sobre as histonas, diminuindo, assim, a interação destas com os grupos fosfatos do DNA. Consequentemente, a cromatina fica mais relaxada, permitindo o acesso de fatores necessários à transcrição ao DNA, assim aumentando os níveis transcricionais de genes presentes na região em questão⁶⁴. Outros modelos sugerem que genes transcricionalmente ativos estariam correlacionados com o rápido *turn-over* na acetilação das histonas. Tal modelo exigiria que as histona acetiltransferases (HATs), que acetilam histonas, e histona desacetilases (HDACs), que desacetilam histonas, agissem em conjunto na cauda das histonas afetadas para manter os genes ativos⁶³.

A fosforilação é um fenômeno menos estudado entre as modificações até aqui descritas, mas de importância na regulação gênica. A fosforilação da histona H3 tem obtido maior destaque e tem sido associada à condensação e segregação cromossômica, ativação da transcrição, apoptose e reparação do

DNA. Tal modificação teria um papel especialmente importante no controle do ciclo celular vegetal⁶⁵.

A maioria das enzimas modificadoras de histonas em plantas são codificadas por famílias multigênicas. Mais de 15 membros de HATs foram encontrados em *Arabidopsis*⁶⁶. Já as HDACs de plantas podem ser agrupadas em quatro subclasses⁶², sendo que três delas parecem ter homologia primária com três classes de HDACs (RPD3, HDA1 e SIR2) encontradas em leveduras e células animais. Já a quarta classe de HDACs, conhecida como classe HD2, é encontrada somente em plantas^{67,68}.

A maioria das metilações nas lisinas das histonas é catalisada por proteínas chamadas (Su(var)3-9, E(Z) e Trithorax)-*domain* (SET). Existem 39 genes com domínio SET encontrados em *Arabidopsis*. Entretanto, a metilação H3K9 em *Arabidopsis* é mantida por homólogos de *Drosophila* SU(-VAR)3-9, chamados proteínas Su(var)3-9 homolog (SUVH)⁶⁹⁻⁷¹.

Estudos mostram que proteínas do grupo Polycomb (PcG, por exemplo: Polycomb *Repressive Complex 2* – PRC2) reprimem a expressão gênica mediando a metilação de H3K27 nos *loci*-alvo⁷². Proteínas PcG que possuem o domínio SET, MEDEA (MEA), CURLY LEAF (CLF) e SWINGER (SWN), por exemplo, são requeridas para o silenciamento mediado por H3K27me3 em genes importantes no desenvolvimento vegetal. Homólogos de proteínas Jumonji, uma classe de enzimas desmetiladoras descobertas após a LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1 (LSD1) também parecem ter papel importante no desenvolvimento vegetal⁷³.

As modificações em histonas têm sido comumente relacionadas a respostas a estresses⁷⁴. Alguns exemplos são: aumento de H3K4me3 e H3K9ac em regiões promotoras de alguns genes responsivos a estresse por seca^{75,76}; mudanças de H3K4me1, H3K4me2 e H3K4me3 no genoma de *Arabidopsis* em resposta à seca⁷⁷; indução da expressão de HDACs em milho submetido a estresse por frio [Hu, 2011, Trichostatin A selectively suppresses the cold-induced transcription of the ZmDREB1 gene in maize]⁷⁸; decréscimo de H3K27me3 em COR15A (*cold-regulated gene 15°*) e ATGOLS3 em resposta a estresse por frio em *Arabidopsis*⁷⁹.

Maiores estudos da relação funcional entre fatores de modificação de histonas, rotas de pequenos RNAs interferentes (*small interfering RNA* – siRNAs) e de metilação de DNA, responsáveis por programas epigenéticos importantes no desenvolvimento em longo e curto prazo e em resposta a condições ambientais, seria crucial para decodificar o “código das histonas”.

17.5.3 Pequenos RNAs

Os pequenos RNAs (*small RNAs* – sRNAs) podem modificar a expressão de RNA mensageiro através da clivagem dos transcritos, repressão da tradução, ou pela metilação do DNA⁸⁰. A função dos sRNAs está relacionada com o seu tamanho: se possuírem 21 nucleotídeos (nts) de comprimento, o silenciamento é pós-transcricional; se possuírem 24 nts, o silenciamento deve-se à metilação do DNA dependente de RNA^{81,82}.

Os sRNAs têm importante ação na regulação genética e epigenética em resposta a estresses^{83,84}, bem como no crescimento e desenvolvimento⁸⁵ devido ao silenciamento transcricional por metilação de DNA dirigida por RNA (*RNA-directed DNA methylation* – RdDM). Nesse mecanismo, a produção de transcritos requeridos para a biogênese de siRNAs é mediada pela RNA polimerase II (RNAP II) e polimerase IV (RNAP IV), pela via de interferência de RNA. Inicialmente, RNAs fita única produzidos pela transcrição mediada pela RNA polimerase IV (RNAP IV) de DNA metilado são convertidos em RNA fita dupla (*double stranded RNAs* – dsRNA) pela RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase 2* – RDR2). Esses RNAs são então processados pela DICER-LIKE 3 (DCL3), processo seguido pela HUA ENHANCER 1 (HEN1), que possui atividade metiltransferase, e então carregados nas argonautas (AGO). Esse complexo então interage com a maior subunidade da RNA polimerase V (RNAP V). Essa maquinaria toda é recrutada na sequência de DNA homóloga, permitindo a metilação pela DRM2. Além disso, a AGO4 também se liga, especificamente, a promotores de forma facilitada por longos RNAs não codificantes (*long noncoding RNA* – lncRNAs) derivados da RNAP IV. O recrutamento desse complexo guia a metilação assimétrica CpNpN em regiões promotoras, sendo importante na regulação da expressão gênica⁸⁶.

17.5.4 Relação entre epigenética e estresse

A metilação do DNA é controlada por fluxos hormonais, os quais são influenciados por diferentes fatores, entre eles estresses bióticos e abióticos⁸⁷, sendo que tais modificações podem contribuir para a adaptação do organismo⁸⁸. As condições ambientais têm impacto sobre um grande número de diferentes marcas e mecanismos genéticos e epigenéticos, incluindo a metilação do DNA, modificações das histonas ou de frequências de recombinação homóloga, bem como rearranjos genômicos^{76,88-91}. Estresses abióticos podem

causar tanto hipermetilação quanto hipometilação⁹²⁻⁹⁵, podendo ativar elementos transponíveis⁴⁰ de importância na adaptação ao estresse.

Estudos que mostram que plantas transmitem seus epialelos à progênie^{91,96-99} levam a crer que modificações epigenéticas possam ser ainda um novo nível para a herança fenotípica, sendo possível, inclusive, que tais modificações possam aumentar o potencial evolutivo de organismos em resposta ao estresse abiótico¹⁰⁰. Bräutigam et al.¹⁰¹, estudando espécies florestais, consideraram que a epigenética constitui-se numa importante fonte de características adaptativas de interesse para o melhoramento, biotecnologia e para conservação do ecossistema, especialmente considerando-se o atual contexto de rápidas mudanças climáticas.

O nível de citosinas metiladas já foi medido em progênies de plantas tratadas e não tratadas por duas gerações, mostrando que, em geral, a metilação do DNA parece decrescer durante a ausência de estresse¹⁰². O envolvimento de uma variante de histona (H2A.Z) mostrou-se responsável por mediar a adaptação a curto prazo à mudança de temperatura em *A. thaliana*¹⁰³, e a hipometilação e transposição de um elemento transponível (Tam-3) em resposta a estresse por frio foi observada em *Antirrhinum*¹⁰⁴. Já num estudo feito recentemente¹⁰⁵, foi verificado que é possível a metilação de regiões promotoras de alguns genes *ethylene response factors* (ERFs), uma família de genes frequentemente relacionada à adaptação a estresses, seja responsável pela modificação da expressão transcricional desses genes em condições de deficiência de oxigênio, impossibilitando o acesso de fatores de transcrição a determinados elementos *cis*.

17.6 REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL E ESTRESSE

A regulação pós-transcricional refere-se ao controle da expressão gênica no nível de RNA, ou seja, entre a transcrição e a tradução do gene¹⁰⁶. A quantidade de mRNA disponível para tradução pode ser afetada em diferentes etapas do processo de maturação, desde a transcrição ao *splicing*, do transporte ao início da tradução. Após produzida a estabilidade, a distribuição de diferentes transcritos é regulada por meio de RBP (*RNA binding proteins*) que controlam várias etapas posteriores à transcrição: *splicing alternativo*, degradação nuclear, processamento, exportação nuclear, entre outros. Essas proteínas realizam esse evento graças ao RRM (*RNA recognition motif*) que se liga a sequências específicas, tipicamente nas UTRs 5' e 3' dos transcritos.

Duas famílias principais de proteínas, as proteínas de ligação ao RNA e as helicases de RNA, determinam o destino dos pré-mRNAs e mRNAs pela regulação dos passos da transcrição até a tradução. As proteínas de ligação ao RNA ligam-se a moléculas de RNA imediatamente após a transcrição, constituindo os complexos mRNP (*mRNA-protein*), até a tradução¹⁰⁷. RNA helicases catalisam rearranjos estruturais, atuando como chaperonas e permitindo que as moléculas de RNA dobrem-se corretamente¹⁰⁸. Além disso, RNA helicases promovem a remoção das proteínas de ligação ao RNA antes da tradução¹⁰⁹.

A seguir, será feita uma descrição de alguns dos mais importantes eventos que influenciam a regulação gênica pós-transcricionalmente.

17.6.1 Capeamento

O capeamento (Figura 17.7) consiste na modificação da extremidade 5' do mRNA, a qual é gerada pela ligação 5'-5' trifosfato entre a extremidade 5' de uma molécula de mRNA precursora e um nucleotídeo alterado (guanosina monofosfato metilado – GMP metilado). O capeamento 5' é importante no processamento do RNA, transporte nuclear e iniciação da tradução¹¹⁰. Ele protege o mRNA da ação de ribonucleases e também é responsável por interagir com complexos proteicos que processam, exportam o mRNA para o citosol e promovem a ligação deste com os ribossomos.

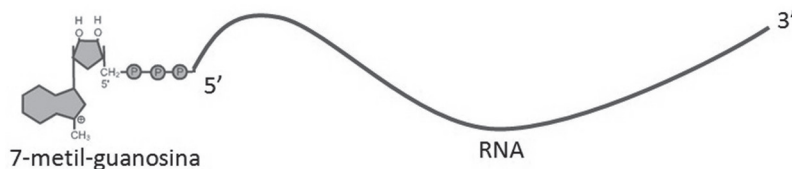


Figura 17.7 Ilustração do capeamento do RNA mensageiro com a colocação de uma 7-metil-guanosina na extremidade 5'.

17.6.2 Splicing

O *splicing* (Figura 17.8) é o processo de remoção dos íntrons depois da transcrição do RNA. O *splicing* só ocorre em eucariotos, já que procariotos não possuem íntrons. Este processo foi descoberto por Richard J. Roberts e Phillip A. Sharp, que receberam um prêmio Nobel em 1993 pela descoberta.

O responsável pelo *splicing* é o spliceossomo, um complexo de RNAs e proteínas que se liga de cada lado dos íntrons, faz um *looping* nas moléculas de RNA e as cliva, assim unindo as extremidades dos éxons. Um exemplo bem atual da importância do *splicing* é a influência do *timing* dessa modificação na disponibilidade de transcritos de genes de resposta inflamatória¹¹¹.

Aproximadamente 35% a 60% dos genes humanos¹¹², e 20% a 60% dos genes de plantas, sofrem o chamado *splicing alternativo*¹¹³. Esse evento pode levar a mudanças funcionalmente relevantes nas proteínas, formando diferentes polipeptídeos, com funções ou locais subcelulares também diferentes a partir de um mesmo gene. Dos diferentes tipos de *splicing alternativos* conhecidos, a “retenção de íntron” é o tipo mais comum em *Arabidopsis* e arroz^{114,115}.

Eventos de *splicing alternativo* parecem ocorrer preferencialmente em mRNAs de determinadas classes de genes normalmente envolvidos na transdução de sinal, ou que codificam enzimas, receptores e fatores de transcrição¹¹⁶. Em plantas, alguns fatores de transcrição sofrem *splicing* em resposta a condições ambientais¹¹⁷⁻¹¹⁹.

As “proteínas serina/arginina”, por exemplo, são uma classe de proteínas de ligação ao RNA, com papel no controle de *splicing*. Elas são conhecidas por promover o *splicing alternativo* dos seus próprios transcritos, bem como de outros^{120,121}. A regulação por *splicing alternativo* de genes cujos produtos, por sua vez, alteram o *splicing* de outros genes pode aumentar a cascata de transdução de sinal em resposta a estímulos estressores.

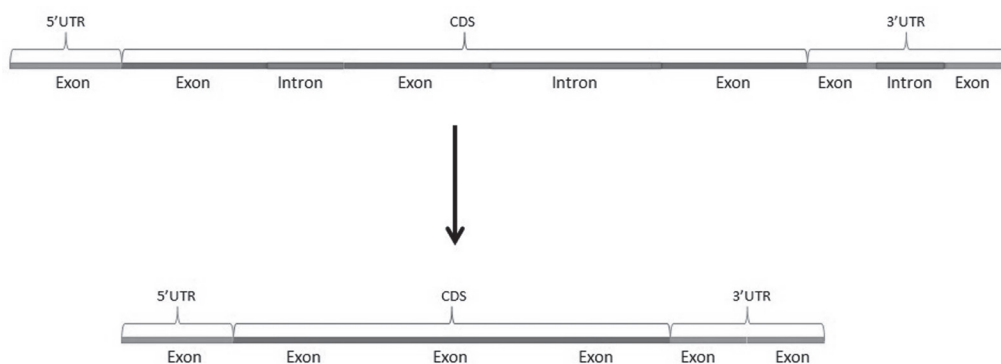


Figura 17.8 *Splicing* da molécula de RNA dando origem a uma molécula de mRNA madura, sem íntrons.

17.6.3 Poliadenilação

A poliadenilação (Figura 17.9) consiste na ligação de uma cauda poli(A) à molécula de RNA mensageiro. Nos eucariotos, a maioria das moléculas de RNA mensageiro termina com a cauda poliadenilada na extremidade 3', que é importante para a estabilidade do mRNA, promove a eficiência traducional do mRNA e tem papel no transporte do mRNA maduro do núcleo para o citoplasma¹²², sendo um importante passo na regulação pós-transcricional.

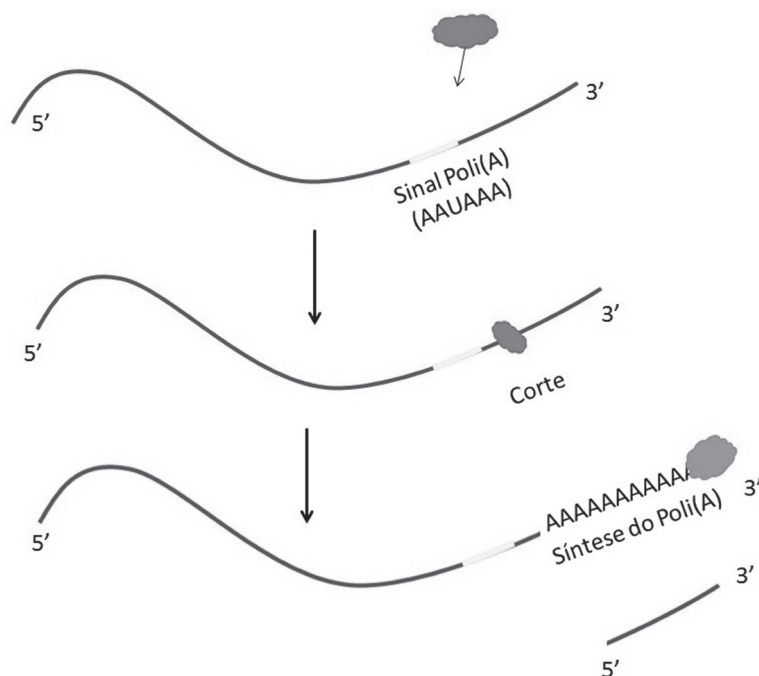


Figura 17.9 Processo de poliadenilação do mRNA. Após o reconhecimento do sinal de AAUAAA, a extremidade 3' é removida por um complexo enzimático, onde então se dará a síntese da cauda poli (A).

17.6.4 Edição de RNA

A edição de RNA (Figura 17.10) é um processo molecular em que algumas células conseguem fazer pequenas modificações na sequência de nucleotídeos de uma molécula de RNA após esta já ter sido gerada. A edição de RNA é relativamente rara, e formas comuns de processamento de RNA como *splicing*, capeamento 5' e poliadenilação não são vistas como formas

de edição de RNA. Esses eventos podem incluir a inserção, deleção e conversão de bases de nucleotídeos no interior da molécula de RNA editado, sendo uma forma importante de regulação pós-transcricional¹²³. O processo de edição de RNA tem importância não só no desenvolvimento do vegetal, mas também na resposta a estresses¹²⁴.

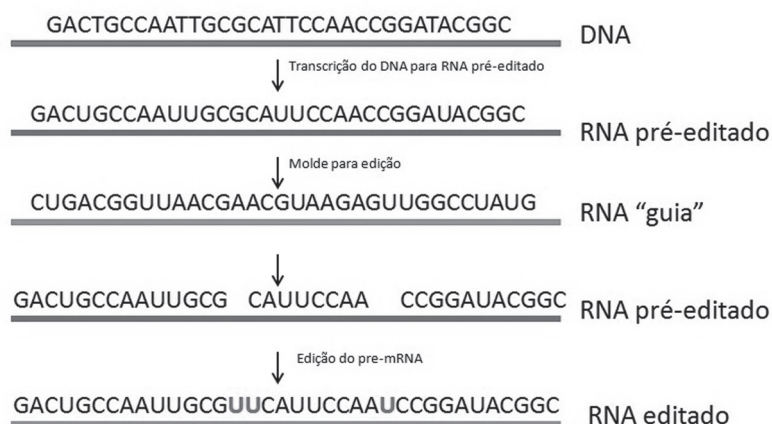


Figura 17.10 Etapas da edição de RNA.

17.6.5 Tráfego nuclear

As únicas vias de tráfego macromolecular entre o citoplasma e o núcleo são os poros nucleares e grandes complexos multiproteicos incorporados no envelope nuclear¹²⁵. Eles consistem em várias cópias de diferentes proteínas chamadas nucleoporinas. A regulação gênica em eucariotos requer a transdução de sinais do ambiente para o núcleo por meio de proteínas reguladoras específicas e a exportação de mRNAs e RNAs não codificantes do núcleo para o citoplasma. A exportação de mRNA requer uma RNA helicase e várias nucleoporinas, além das proteínas de ligação ao RNA¹²⁶. Já as proteínas chamadas carioferinas medeiam o transporte de outras proteínas e moléculas de RNA não codificantes através do envelope nuclear^{127,128}. As carioferinas reconhecem o sinal de localização nuclear de proteínas e ácidos nucleicos e formam um complexo heterotrimérico com estes. Este complexo é em seguida voltado para o poro nuclear através da interação direta de uma carioferina com nucleoporinas específicas, sendo então translocado para o núcleo¹²⁹.

O tráfego núcleo-citoplasmático é um evento regulado (Figura 17.11). Trabalhos recentes têm sugerido que nucleoporinas e carioferinas estejam envolvidas em muitos aspectos da vida vegetal, incluindo a resposta a estresse abiótico, por afetar a importação e a exportação nuclear^{125,130}.

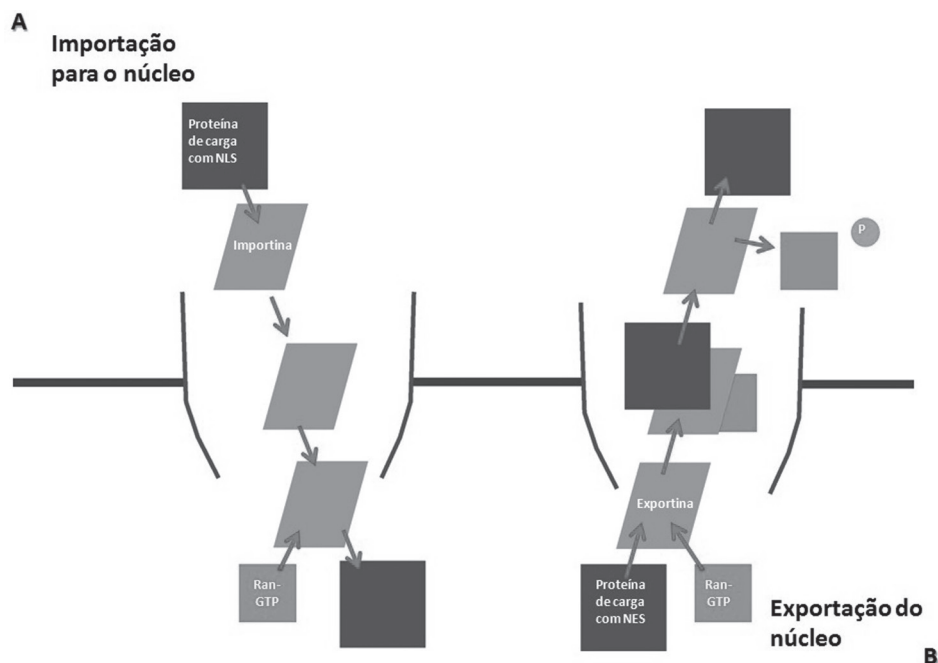


Figura 17.11 Tráfego macromolecular entre o citoplasma e o núcleo mediado por carioferinas chamadas (A) importinas (na importação) e (B) exportinas (na exportação). Mais informações podem ser encontradas no texto e nas referências.

17.6.6 natsiRNAs e miRNAs

O estudo dos microRNAs (miRNAs) e dos siRNAs endógenos tem demonstrado grande importância destes na rede de regulação de resposta a estresses nas plantas¹³¹. Esses pequenos RNAs não codificantes silenciam genes-alvos pós-transcricionalmente, quer orientando a degradação, quer reprimindo a tradução dos mRNAs-alvos^{132,133}.

A modificação da transcrição de miRNAs ocorre em resposta ao estresse^{131,134,135}, e miRNAs podem ainda causar mudanças das rotas de ubiquitinação de forma estresse dependente¹³⁶. Genomas eucarióticos contêm muitos genes sobrepostos, aproximadamente 10% dos genes de *Arabidopsis*,

são pares de genes convergentes sobrepostos, também conhecidos como pares de genes *cis*-antisense naturais^{137,138}. Apesar de sua importância funcional não ser conhecida, uma possibilidade intrigante é que transcritos sobrepostos em orientação antisense formem RNAs de fita dupla que podem ser transformados em siRNAs. Estes, assim chamados nat-siRNAs (*natural antisense transcripts-generated siRNAs*) surgiram como importantes atores na resposta vegetal a estresses¹³⁹. Um resumo das etapas das rotas de silenciamento por RNA é apresentado na Figura 17.12.

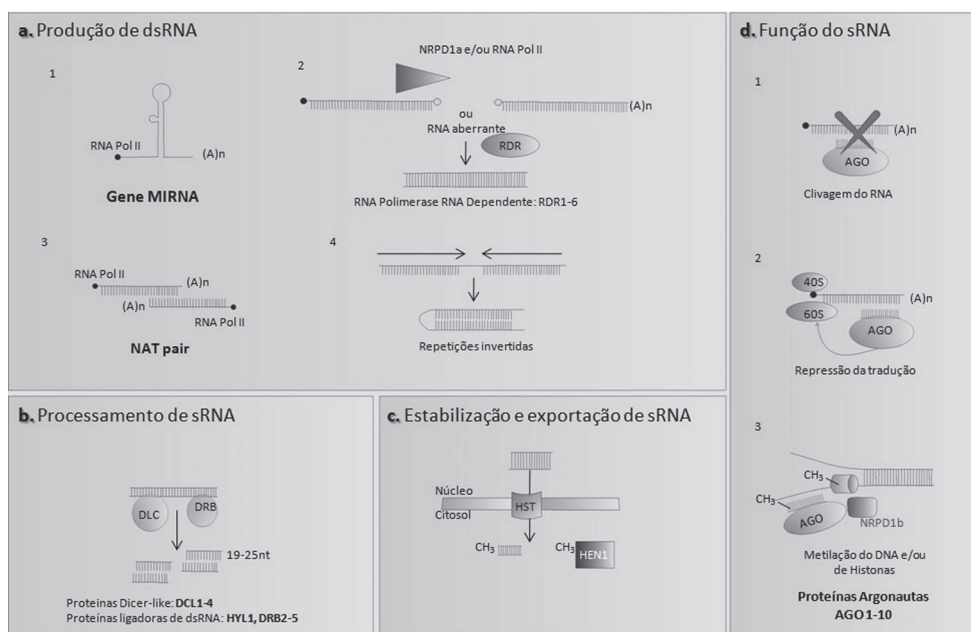


Figura 17.12 Etapas das rotas de silenciamento por RNA. (a) Várias fontes de RNAs dupla-fita (dsRNA) (b) processados em pequenos RNAs (sRNAs) por uma ou quatro *dicer-like proteins* (DCLs) com a assistência de *dsRNA-binding proteins*; (c) estabilização do sRNA mediada por HUA ENHANCER 1 (HEN1) e exportação por HASTY (HST); (d) forma de operação do sRNA. Figura modificada de Ruiz-Ferrer e Voinnet (2009)⁸³.

17.7 REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL E ESTRESSE

A resposta molecular das plantas ao estresse abiótico é um processo complexo, e se dá principalmente com base na modulação da atividade transcricional; entretanto, como já vimos, outros mecanismos pós-transcricionais baseados em *splicing* alternativo, processamento de RNA, bem como

silenciamento de RNA, podem também modificar a resposta vegetal a estresses. A regulação pós-traducional refere-se ao controle dos níveis de proteína ativa através de modificações desta após a sua formação/tradução, como foi visto no caso das histonas (metilação, acetilação). Além de fosforilação de proteínas, outras modificações pós-traducionais, como ubiquitinação e sumoilação, podem também regular a ativação de moléculas preexistentes para garantir uma resposta rápida a estresses¹⁴⁰.

17.7.1 Ubiquitinação e degradação responsiva a estresse

A ubiquitinação é a ligação covalente de uma pequena proteína chamada ubiquitina às proteínas-alvos¹⁴¹. A fixação da ubiquitina é mediada pela ação conjunta de três enzimas: enzima de ativação da ubiquitina (E1), enzima de conjugação da ubiquitina (E2) e a ubiquitina-ligase (E3), sendo que esta última é responsável pela especificidade da ubiquitinação¹⁴². A adição de uma cadeia multiubiquitina geralmente marca proteínas para degradação intracelular através do proteossoma 26S (Figura 17.13), uma protease de subunidades múltiplas dependente de ATP, cuja principal função é a degradação por proteólise. Entre as proteínas marcadas para degradação estão as com dobramento incorreto e proteínas que não são mais necessárias para a célula. A monoubiquitinação, entretanto, pode regular o reparo do DNA, função de histonas, expressão gênica, entre outros processos¹⁴³.

Uma série de estudos tem hipotetizado que a degradação de proteínas seja dependente de ubiquitina nos mecanismos de sinalização e resposta a estresse^{144,145}. Análises de transcriptomas e proteomas, realizadas em diferentes espécies vegetais submetidas à exposição de estresses abióticos, indicou que centenas de transcritos/proteínas relacionados à ubiquitinação são modificados durante a resposta ao estresse, sugerindo importância da ubiquitinação na determinação da tolerância ao estresse^{142,146-148}.

Variações nas atividades de ligase E3 podem ser alcançadas através de alterações na expressão dos seus correspondentes mRNAs¹⁴², na indução de variantes de *splicing*^{119,149}, silenciamento mediado por miRNA¹³¹ e fosforilação¹⁵⁰. Além disso, dado que a ubiquitinação e a sumoilação reconhecem a mesma lisina, a sumoilação pode impedir a degradação da proteína, impedindo a ligação de ubiquitina¹⁵¹. A atividade de ligase E3 também pode ser aumentada por alterações conformacionais devido à ligação de determinadas moléculas. A interação de moléculas de auxina, jasmonato ou giberelina, que são hormônios reguladores do crescimento e desenvolvimento de plantas,

com o receptor *F-box*, provoca uma mudança conformacional no complexo ligase E3 correspondente, resultando na ativação da enzima e subsequente degradação de proteínas-alvo¹⁵²⁻¹⁵⁴.

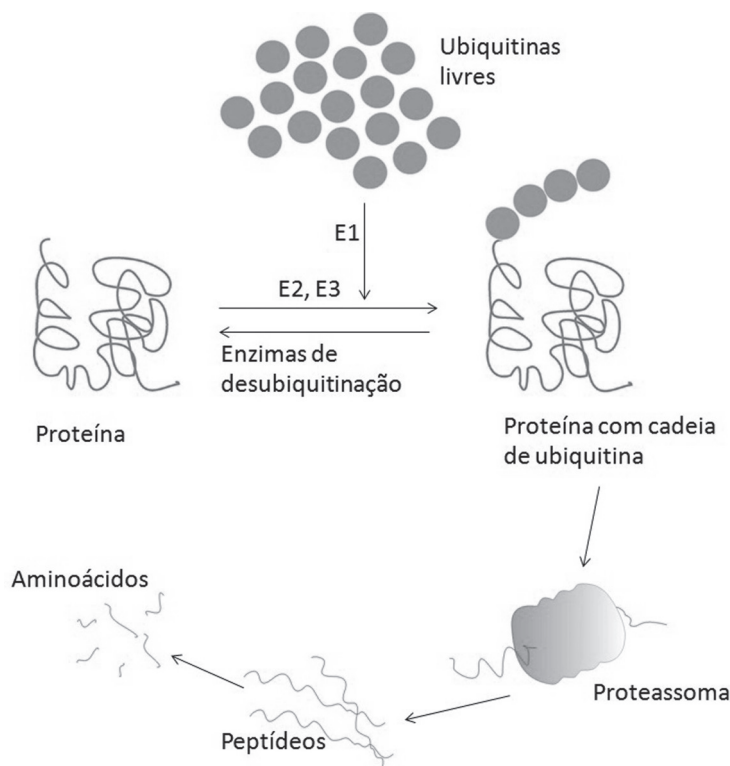


Figura 17.13 Adição de cadeia multiubiquitina e degradação de proteínas pelo proteassoma.

17.7.2 Sumoilação na resposta a estresse

A sumoilação é uma modificação pós-traducional reversível com base na conjugação covalente do peptídeo SUMO (*small ubiquitin-like modifier*)¹⁵⁵. Os passos de conjugação são semelhantes àqueles que operam na via de ubiquitinação. Em contraste com a maioria dos sistemas de conjugação de ubiquitina, que dependem de ligases E3 para reconhecimento específico das proteínas-alvo, as enzimas E2 e E3 da maquinaria de sumoilação atuam em muitas proteínas diferentes.

A sumoilação altera a função da proteína mascarando ou adicionando superfícies de interação, bem como através da indução de alterações conformacionais. Uma grande variedade de efeitos biológicos da sumoilação foram observados, incluindo realocização subcelular, alterações na atividade enzimática e proteção da degradação mediada por ubiquitina. A conjugação ao SUMO pode promover ou reprimir a transcrição através da importação nuclear de fatores de transcrição. SUMO pode influenciar a montagem (*assembly*) de fatores de transcrição em promotores ou o recrutamento de enzimas modificadoras da cromatina, acima de tudo, quando associada à repressão da transcrição¹⁵⁶.

Análises de perda e ganho de função, bem como o padrão de SUMO-conjugados revelou um papel essencial da sumoilação em plantas em resposta a sinais ambientais. A análise de expressão em larga escala do genoma de *Arabidopsis* identificou 300 de 1.700 sequências induzidas por seca, cuja indução é mediada pelo SUMO E3 ligase SIZ1¹⁵⁷. Mutantes *siz1* de *Arabidopsis*, por exemplo, são menos tolerantes a estresses¹⁵⁷⁻¹⁶⁰.

17.8 COMBINAÇÃO DE REDES REGULATÓRIAS

Existe uma rede combinatória de regulação transcricional, pós-transcricional e pós-traducional, existindo ações recíprocas entre os diferentes tipos de regulação gênica (Figura 17.14). Assim, uma crescente variedade de mecanismos de interação que moldam o transcriptoma e o proteoma, contribuindo para o ajuste fino do metabolismo celular, vem se revelando.

17.9 TÉCNICA

Como relatado no início deste capítulo, várias técnicas podem ser utilizadas para a quantificação da expressão transcricional. Tais técnicas estão descritas e disponíveis na literatura²⁷⁻³⁵, e o mesmo ocorre para outras técnicas de interesse no estudo da regulação gênica e para análise de modificações epigenéticas. O número de técnicas disponíveis é tão grande que livros inteiros são escritos somente para descrever alguns grupos delas¹⁶¹⁻¹⁶³. As técnicas utilizadas devem ser escolhidas de acordo com o objetivo específico do estudo em questão. Novas técnicas surgem constantemente, oferecendo novas possibilidades de estudo, ou tornando outras obsoletas devido ao aumento de precisão, de espectro, ou pela diminuição dos custos.

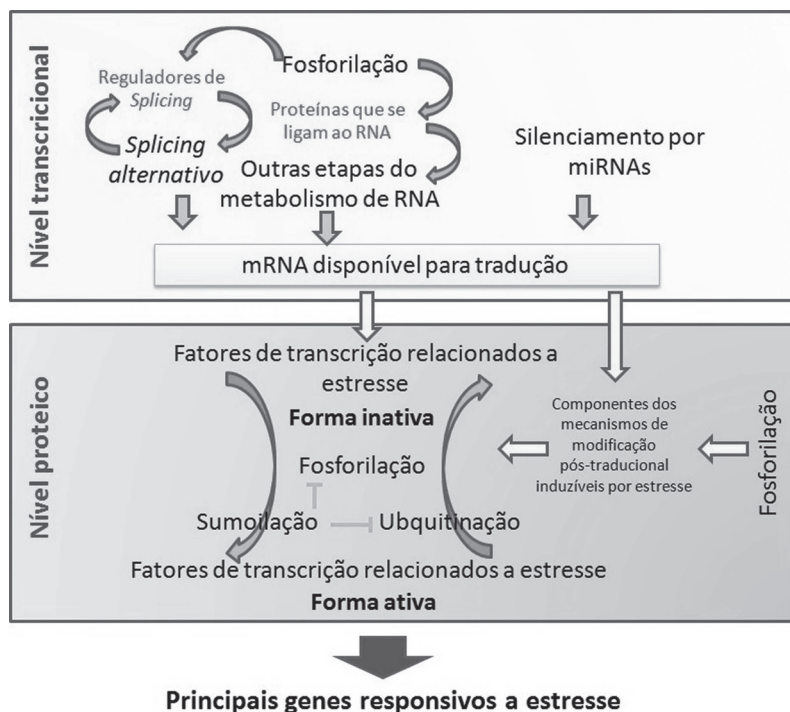


Figura 17.14 Modelo do *cross-talking* entre formas de regulação pós-transcricional e pós-traducional envolvidas no controle da resposta vegetal a estresse. Figura modificada de Mazzucotelli et al. (2008)¹⁴⁰.

Em função da variedade de técnicas existentes e da impossibilidade de descrevê-las em detalhes, optou-se pela descrição de uma técnica de análise epigenética que vem sendo bastante utilizada: a conversão de citosinas não metiladas com bissulfito de sódio seguida de sequenciamento. Tal técnica tem variações, podendo ser feita utilizando-se materiais diferentes; assim sendo, salienta-se aqui que os materiais e empresas citados não devem ser obrigatoriamente utilizados como parte do protocolo, servindo apenas de exemplo.

A conversão seguida de sequenciamento consiste no tratamento do DNA com bissulfito de sódio, que é capaz de realizar uma modificação química no DNA (Figura 17.14) convertendo citosinas não metiladas em uracilas, as quais podem ser substituídas por timinas na replicação (*in vitro* ou *in vivo*). As diferenças entre as sequências podem ser analisadas por sequenciamento, indicando diferenças de metilação entre diferentes moléculas de DNA tratadas com bissulfito.

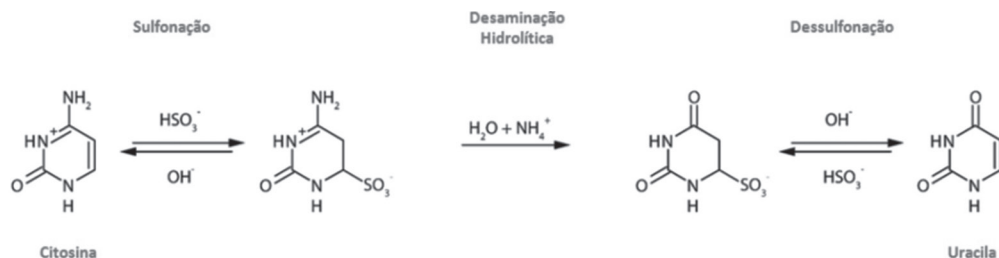


Figura 17.15 Conversão de citosinas não metiladas em uracilas, por meio do uso de bissulfite de sódio.

Protocolo

- **Conversão de citosinas em uracilas:** a conversão de citosinas não metiladas em uracilas pode ser feita com a utilização de diferentes kits comerciais disponíveis, como, por exemplo, o EpiTect Bisulfite Kit (QiagenTM).
- **Amplificação da região de interesse:** a amplificação da região de interesse pode ser feita utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados com a utilização de programas computacionais específicos para isto, como o Methyl Primer Express[®] (Applied BiosystemsTM) ou o Kismeth¹⁶⁴. As condições da reação de amplificação dependerão basicamente dos *primers*, tamanho do fragmento e da *Taq* DNA polimerase utilizada.
- **Corrida em gel e purificação do fragmento:** após a amplificação, o fragmento é corrido em gel e purificado utilizando kits comerciais, como, por exemplo, o PureLink Quick Gel Extraction Kit (InvitrogenTM). O fragmento purificado servirá para clonagem em vetor apropriado e multiplicação em *E. coli* DH5 α ou TOP10.
- **Preparo de células competentes**
 - 1) Em uma placa estéril, adicionar 20 mL de Luria broth (LB) sólido diluído.
 - 2) Deixar polimerizar e estriar uma alíquota de células *E. coli* cepa TOP10 ou DH5 α .
 - 3) Incubar a 37 °C durante 18 horas. Selecionar uma colônia e colocá-la em um frasco com 3 mL de LB líquido.

- 4) Incubar a 37 °C sob agitação durante 18 horas (pré-inóculo).
 - 5) Adicionar o pré-inóculo em um frasco com 250 mL de LB líquido.
 - 6) Incubar a 37 °C sob agitação durante 2 a 3 horas, até atingir densidade ótica (D.O) de 0,4-0,6.
 - 7) Manter o frasco em gelo durante 30 minutos (para cessar o crescimento bacteriano).
 - 8) Colocar em frascos especiais para centrifugação.
 - 9) Centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
 - 10) Descartar o sobrenadante e proceder à lavagem com 20 mL de água apirogênica estéril gelada (agitar até dissolver o precipitado).
 - 11) Centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
 - 12) Descartar o sobrenadante e proceder lavagem com 20 mL de água apirogênica estéril gelada (agitar até dissolver o precipitado).
 - 13) Centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
 - 14) Descartar o sobrenadante e proceder lavagem com 20 mL de água acrescida de 10 % de glicerol estéril gelada (agitar até dissolver o precipitado).
 - 15) Centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
 - 16) Descartar o sobrenadante.
 - 17) Dissolver o precipitado com 250 µL de água acrescida de 10% de glicerol estéril gelada.
 - 18) Fazer alíquotas com 100 µL cada.
 - 19) Proceder à transformação (as demais, armazenar a -70 °C).
- **Reação de ligação vetor com amplicon:** pode-se seguir o protocolo original do produto (por exemplo, TOPO®-TA 2.0), ou alternativamente executar a seguinte reação, a qual é mais econômica: 0,5 µL de vetor de clonagem (15 ng.µL⁻¹ a 20 ng.µL⁻¹); 1,0 µL de produto de PCR (20 ng.µL⁻¹); 0,5 µL de solução salina diluída (1:4 solução salina:água); 1,0 µL de água. Deixar em temperatura ambiente durante 1 hora. Observação: pode-se colocar até duas vezes mais produto de PCR com relação ao vetor.
 - **Transformação*:**
 - 1) Adicionar 1 µL de reação de ligação em 100 µL de células competentes.
 - 2) Colocar em cubeta de 2 mm.
 - 3) Proceder ao choque (25 µF, 200 Ω, 2.500 V).

* Fazer também amostra controle utilizando pUC19, para checar qualidade das células.

- 4) Acrescentar 400 mL de meio LB líquido.
- 5) Incubar a 37 °C sob agitação durante 1 hora.

- **Preparo de placas para vetor TOPO®-TA 2.0:** colocar em cada placa 20 mL de LB sólido diluído acrescido de 20 µL de canamicina (50 mg.mL⁻¹) – Vetor TOPO confere resistência a canamicina; 20 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-Gal, 40 mg.mL⁻¹); 60 µL de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, 100 mM). Preparar 3 placas por amostra (plaquear as bactérias em concentração adequada) e incubar a 37 °C durante 18 horas.

- **Extração de DNA plasmidial:**

- 1) Crescer *Escherichia coli* em cultura líquida a 37 °C.
- 2) 1,5 mL de cultura líquida.
- 3) Centrifugar 10 min em velocidade máxima.
- 4) 300 µL de solução I + 5 µL de Rnase (10 mg.mL⁻¹) → Vortexar bem para ressuspender todo o precipitado.
- 5) 300 µL de solução II; misturar levemente invertendo o tubo (não dar vórtex).
- 6) Deixar 5 minutos à temperatura ambiente.
- 7) 300 µL de solução III.
- 8) Centrifugar 5 minutos em máxima velocidade.
- 9) Coletar o líquido em um microtubo limpo e adicionar 640 µL de isopropanol a cada 800 µL de líquido.
- 10) Centrifugar 20 minutos.
- 11) Remover o máximo possível do isopropanol, com pipeta.
- 12) Lavar o precipitado com etanol 70%.
- 13) Secar bem, com pipeta, dando um *spin* (rápida centrifugação para decantar todo o líquido nos tubos) e pipetando novamente.
- 14) Deixar secar 10 minutos em temperatura ambiente.
- 15) Ressuspender em 20 µL de água ultra pura estéril.
- 16) Aplicar 5 µL em gel de agarose 1% para verificar concentração e pureza.
- 17) Fazer PCR utilizando os iniciadores específicos para verificar a inserção do fragmento de interesse no vetor TOPO.

Tabela 17.1 Preparo das soluções para o Miniprep

| SOLUÇÃO I | SOLUÇÃO II | SOLUÇÃO III |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| Glicose 50 mM | Dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% | 60 mL de acetato e potássio 5M |
| Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pH 8,0 10 mM | NaOH 0,2 N | 11,5 mL de ácido acético glacial |
| TRIS pH 8,0 25 mM | | 28,5 mL água ultrapura estéril |

Verificar quantidade e integridade do DNA em gel de agarose e espectrofotômetro e enviar as amostras para sequenciamento a fim de verificar a integridade do fragmento inserido.

- **Análise dos resultados de sequenciamento:** a análise dos resultados de sequenciamento pode ser feita por diferentes programas, entre eles, o Kismeth¹⁶⁴.

17.10 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O controle transcricional e a rede de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais asseguram temporal e espacialmente padrões apropriados de expressão gênica ao longo do desenvolvimento vegetal e frente a estresses.

Intensificadores e outros elementos regulatórios constituem intermediários-chaves nas redes regulatórias e, para entendê-las, é essencial decifrar as complexas relações entre fatores de transcrição e elementos *cis* regulatórios, bem como a contribuição destes para a expressão gênica. A ação combinatória de múltiplos fatores de transcrição constitui característica chave para interconexão de redes de regulação gênica¹⁷.

Nesse sentido, avanços técnicos marcantes em transcriptômica e metabolômica estão disponíveis para ajudar no entendimento das respostas moleculares a estresses, e as chamadas “análises ômicas” são importantes ferramentas para alcançar esse objetivo. A integração entre metaboloma e transcriptoma revela que muitas importantes rotas metabólicas são reguladas em nível transcricional, já outras são reguladas em nível pós-transcricional, traducional, pós-traducional ou por mecanismos de *feedback*. É importante lembrar que metabólitos não só têm papel funcional direto na tolerância a estresse, mas ainda agem como moléculas sinalizadoras, o que

reforça a necessidade de análises “ômicas” integradas para identificar as funções de redes regulatórias de metabólitos a estresses¹⁶⁵.

A regulação pós-transcricional por RNAs não codificantes (*non-coding RNA* – ncRNAs) como sRNAs e RNAs antissenso (*antisense RNA* – asRNA) se tornaram mais bem compreendidas com recentes avanços em análises de transcriptomas inteiros. Essas análises incluem o uso de microarranjos de alta densidade e técnicas que usam sequenciamento de nova geração, como o *RNA-seq*.

O próximo grande desafio do *RNA-seq* é o sequenciamento de transcriptomas mais complexos, identificar mudanças de expressão de raras isoformas de RNA de todos os genes. Vale lembrar que a constante diminuição dos custos de sequenciamento deverá fazer com que o *RNA-seq* substitua completamente o microarranjo para muitas aplicações que envolvam a determinação da estrutura e dinâmica do transcriptoma.

Notavelmente, as proteínas de ligação ao RNA estão envolvidas em todos os aspectos da regulação das moléculas de RNA, tais como transcrição, *splicing*, e estabilização. Analisar a função dessas proteínas é essencial para compreender os mecanismos de regulação do RNA em resposta a estresses. A identificação e análise de fatores que interagem com essas proteínas irão ajudar a revelar a estrutura e mecanismo de ação de complexos reguladores de RNA⁸⁴.

Apesar dos muitos estudos relacionando a metilação de DNA e a resposta a estresses bióticos e abióticos, muitas perguntas continuam sem solução nesse campo, incluindo a forma como as plantas detectam o estresse, como ativam mecanismos de adaptação e como agem os componentes das vias de metilação. Análises de componentes regulatórios envolvidos na metilação/desmetilação em mutantes deram pistas sobre parte desses processos epigenéticos, mas uma investigação completa é necessária para sua melhor compreensão.

Com genoma relativamente pequeno em relação às demais espécies e protocolos de análise bem delineados, o arroz e *Arabidopsis* ainda são as plantas mais fáceis para se estudar das modificações epigenéticas. Compreender os mecanismos epigenéticos de resposta a estresses ambientais e sua provável aplicação na manipulação genética de plantas é um grande desafio. Dados de diversos metilomas obtidos com novas técnicas de sequenciamento poderão ser usados para selecionar alvos para transformação genética; assim, epialelos descobertos em diferentes estudos poderão ser explorados por programas de melhoramento genético de plantas. Passos iniciais desse processo envolvem a determinação dos padrões de metilação entre os indivíduos na

população selecionada, seguida de exame de padrões de metilação significativos na expressão de diferentes fenótipos. Lembramos que plantas transgênicas de valor comercial, especialmente de arroz, devem ao mesmo tempo possuir produtividade relativamente alta e manter outras características importantes à agricultura em conjunto com a característica de tolerância a determinados estresses.

REFERÊNCIAS

1. Alexandratos N, Bruinsma J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision Rome 2012 [Internet]. [Cited 2013 August 27]. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/templates/esa/Global_perspectives/world_ag_2030_50_2012_rev.pdf.
2. Fischer RA, Byerlee D, Edmeades GO. Can Technology Deliver On The Yield Challenge to 2050? 2009 [Internet]. [Cited 2013 August 17]. Available from: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/ak977e/ak977e00.pdf>.
3. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution – a review of recent-evidence. *Japanese Journal of Genetics*. 1991;66(4):367-86.
4. Masel J. Genetic drift. *Current Biology*. 2011;21(20):R837-R8.
5. Hastings PJ, James RL, Susan MR, Grzegorz I. Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(8):551.
6. Rastogi S, Liberles DA. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evolutionary Biology*. 2005;5.
7. Harrison PM, Gerstein M. Studying Genomes Through the Aeons: Protein Families, Pseudogenes and Proteome Evolution. *Journal of Molecular Biology*. 2002;318(5):1155-74.
8. Eyre-walker A, Keightley PD. The distribution of fitness effects of new mutations. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(8):610.
9. Coulon A, Chow CC, Singer RH, Larson DR. Eukaryotic transcriptional dynamics: from single molecules to cell populations. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(8):572-84.
10. Slack JMW. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nature Reviews Genetics*. 2002;3(11):889.
11. Brasset E, Chambeyron S. Epigenetics and transgenerational inheritance. *Genome Biology*. 2013;14:306.
12. Ahmed F. Epigenetics: Tales of adversity. *Nature*. 2010;468(7327):S20.
13. Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R. The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLoS Biology*. 2010;8(11).
14. Choudhuri S. Gene regulation and molecular toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2004;15(1):1.
15. Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*. 2005;435(7042):637-45.
16. Rose AB. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2008;326:277-90.
17. Spitz F, Furlong EEM. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(9):613.

18. Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein- coding genes. *Annual Review of Genetics*. 2000;34:77.
19. Schoenfelder S, Clay I, Fraser P. The transcriptional interactome: gene expression in 3D. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2010;20(2):127-33.
20. Kaufmann K, Pajoro A, Angenent GC. Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(12):830.
21. Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004;14(3):283-91.
22. Yu HY, Gerstein M. Genomic analysis of the hierarchical structure of regulatory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(40):14724-31.
23. Farnham PJ. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(9):605.
24. Singh KB, Foley RC, Oñate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5(5):430-6.
25. Ljungman M. The transcription stress response. *Cell Cycle*. 2007;6(18):2252-7.
26. Nadal ED, Ammerer G, Posas F. Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(12):833.
27. Smale ST. Nuclear run-on assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009 Nov;2009(11):pdb.prot5329.
28. Carey MF, Peterson CL, Smale ST. The RNase protection assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2013 Mar;2013(3):pdb.prot071910.
29. Tummala P, Mali RS, Guzman E, Zhang X, Mitton KP. Temporal ChIP-on- Chip of RNA- Polymerase- II to detect novel gene activation events during photoreceptor maturation. *Molecular Vision*. 2010;16(31-32):252-71.
30. Sealfon SC, Chu TT. RNA and DNA microarrays. *Methods in Molecular Biology*. 2011:3-34.
31. Yoon JH, Srikantan S, Gorospe M. MS2-TRAP (MS2- tagged RNA affinity purification): Tagging RNA to identify associated miRNAs. *Methods*. 2012;58(2):81-7.
32. O'Connor C. Fluorescence *in situ* hybridization. *Nature Education*. 2008;1(1).
33. Bhardwaj AR, Pandey R, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S. Northern blot analysis for expression profiling of mRNAs and small RNAs. *Methods in Molecular Biology*. 2012:26.
34. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA- Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57.
35. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005:75-85.

36. Richards EJ. Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(5):395.
37. Richards CL, Bosssdorf O, Pigliucci M. What Role Does Heritable Epigenetic Variation Play in Phenotypic Evolution? *Bioscience*. 2010;60(3):232-7.
38. Vanyushin BF, Ashapkin VV. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1809:360-8.
39. Sahu P, Pandey G, Sharma N, Puranik S, Muthamilarasan M, Prasad M. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*. 2013;32(8):1151-9.
40. Steward N, Kusano T, Sano H. Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(17):3250.
41. Karlsson M, Weber W, Fussenegger M. *De novo* design and construction of an inducible gene expression system in mammalian cells. *Methods in Enzymology*. 2011:239-53.
42. Lindroth AM, Cao XF, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, et al. Requirement of Chromomethylase3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*. 2001;292(5524):2077-80.
43. Tompa R, McCallum CM, Delrow J, Henikoff JG, van Steensel B, Henikoff S. Genome- Wide Profiling of DNA Methylation Reveals Transposon Targets of Chromomethylase 3. *Current Biology*. 2002;12(1):65-8.
44. Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, Mette MF, Huang MS, Matzke M, et al. Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA – Directed DNA Methylation. *Current Biology*. 2003;13(24):2212-7.
45. Cao X, Jacobsen SE. Role of the Arabidopsis DRM Methyltransferases in *de novo* DNA Methylation and Gene Silencing. *Current Biology*. 2002;12(13):1138-44.
46. Wada Y, Ohya H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. Preferential *de novo* methylation of cytosine residues in non- CpG sequences by a domains rearranged DNA methyltransferase from tobacco plants. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(43):42386.
47. Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddeloh JA, et al. Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*. 2003;163(3):1109.
48. Zhu JH, Kapoor A, Sridhar VV, Agius F, Zhu JK. The DNA glycosylase/ lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis. *Current Biology*. 2007;17(1):54-9.
49. Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Henikoff S, Fischer RL. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(16):6752-7.

50. Schafer A, Karaulanov E, Stapf U, Doderlein G, Niehrs C. Ing1 functions in DNA demethylation by directing Gadd45a to H3K4me3. *Genes & Development*. 2013;27(3):261-73.
51. Franchini D-M, Schmitz K-M, Petersen-Mahrt SK. 5- Methylcytosine DNA Demethylation: More Than Losing a Methyl Group.(Report). *Annual Review of Genetics*. 2012;46:419.
52. Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eucaryotic DNA methylation. *Science*. 2010;916-9.
53. Zhang XY, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, Chen HM, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*. 2006;126(6):1189-201.
54. Gehring M, Henikoff S. DNA methylation dynamics in plant genomes. *BBA – Gene Structure and Expression*. 2007;1769(5):276-86.
55. Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*. 2007;39(1):61-9.
56. Vasquero A, Loyola A, Reinberg D. The Constantly Changing Face of Chromatin. *Science of Aging Knowledge Environment*. 2003;2003:RE4.
57. Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004;11(11):1037-43.
58. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128:693-705.
59. Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*. 2013;439-45.
60. Cloos PAC, Christensen J, Agger K, Helin K. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes & Development*. 2008;22(9):1115-40.
61. Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E, Buisine N, et al. *Arabidopsis* TFL2/ LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genetics*. 2007;3(6):855-66.
62. Zhang XY, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J, et al. Whole- genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*. 2007;5(5):1026-35.
63. Shahbazian MD, Grunstein M. Function of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual Review of Biochemistry*. 2007:75-100.
64. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389(6649):349.
65. Houbena A, Demidova D, Capertab AD, Karimia R, Aguecia F, Vlasenko L. Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1769:308-15.

66. Zhou DX. Regulatory mechanism of histone epigenetic modifications in plants. *Epigenetics*. 2009;4(1):15-8.
67. Huang LM, Sun QW, Qin FJ, Li C, Zhao Y, Zhou DX. Down- regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2- related histone deacetylase gene, OsSRT1, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiology*. 2007;144(3):1508-19.
68. Pandey R, Müller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, et al. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(23):5036.
69. Jackson JP, Lindroth AM, Cao XF, Jacobsen SE. Control of CpNpG DNA methylation by the Kryptonite histone H3 methyltransferase. *Nature*. 2002;416(6880):556-60.
70. Ebbs ML, Bartee L, Bender J. H3 Lysine 9 Methylation Is Maintained on a Transcribed Inverted Repeat by Combined Action of SUVH6 and SUVH4 Methyltransferases. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;25(23):10507.
71. Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmeler K, et al. Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*. 2005;24(7):1418.
72. Pien S, Grossniklaus U. Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1769:375-82.
73. Chen X, Hu Y, Zhou DX. Epigenetic gene regulation by plant Jumonji group of histone demethylase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1809:6.
74. Yuan L, Liu X, Luo M, Yang S, Wu KJ. Involvement of Histone Modifications in Plant Abiotic Stress Responses. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2013;1-10.
75. Kim JM, To TK, Ishida J, Morosawa T, Kawashima M, Matsui A, et al. Alterations of Lysine Modifications on the Histone H3 N- Tail under Drought Stress Conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 2008;49(10):1580-8.
76. Chinnusamy V, Zhu J-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009;12(2):133-9.
77. van Dijk K, Ding Y, Malkaram S, Riethoven JJM, Liu R, Yang JY, et al. Dynamic changes in genome- wide histone H3 lysine 4 methylation patterns in response to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. 2010;10.
78. Hu Y, Zhang L, Zhao L, Li J, He S, Zhou K, et al. Trichostatin A selectively suppresses the cold- induced transcription of the ZmDREB1 gene in maize. *PloS One*. 2011;6(7):e22132.
79. Kwon CS, Lee D, Choi G, Chung WI. Histone occupancy-dependent and -independent removal of H3K27 trimethylation at cold- responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2009;60(1):112-21.
80. Ramachandran V, Chen X. Small RNA metabolism in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. 2008;13(7):368-74.

81. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(4):272.
82. Schwach F, Moxon S, Moulton V, Dalmay T. Deciphering the diversity of small RNAs in plants: the long and short of it. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 2009;8(6):472.
83. Ruiz-Ferrer V, Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. (Report). *Annual Review of Plant Biology*. 2009;60:485-510.
84. Nakaminami K, Matsui A, Shinozaki K, Seki M. RNA regulation in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;149-53.
85. Chen X. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2009. p. 21-44.
86. Zheng Q, Rowley MJ, Bohmdorfer G, Sandhu D, Gregory BD, Wierzbicki AT. RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *The Plant Journal*. 2013;73(2):179-89.
87. Zhang L, Wang Y, Zhang XH, Zhang M, Han DG, Qiu CP, et al. Dynamics of phytohormone and DNA methylation patterns changes during dormancy induction in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Cell Reports*. 2012;31(1):155-65.
88. Mirouze M, Paszkowski J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2011;14(3):267-74.
89. Bond DM, Finnegan EJ. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends in Plant Science*. 2007;12(5):211-6.
90. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(2):97.
91. Hauser M, Aufsatz W, Jonak C, Luschnig C. Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;10.
92. Kovarik A, Koukalova B, Bezdek M, Opatrny Z. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997;95(1-2):301-6.
93. Dyachenko OV, Zakharchenko NS, Shevchuk TV, Bohnert HJ, Cushman JC, Buryanov YI. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of *Mesembryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress. *Biochemistry (Moscow)*. 2006;71(4):461-5.
94. Choi CS, Sano H. Abiotic- stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase- like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*. 2007;277(5):589-600.
95. Boyko A, Kathiria P, Zemp FJ, Yao Y, Pogribny I, Kovalchuk I. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants: (virus-induced plant genome instability). *Nucleic Acids Research*. 2007;35(5):1714.

96. Hollick JB, Patterson GI, Coe EH, Cone KC, Chandler VL. Allelic interactions heritably alter the activity of a metastable maize pl allele. *Genetics*. 1995;141(2):709.
97. Stokes TL, Kunkel BN, Richards EJ. Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. *Genes & Development*. 2002;16(2):171-82.
98. Verhoeven KJF, Jansen JJ, van Dijk PJ, Biere A. Stress- induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist*. 2010;185(4):1108-18.
99. Feng Q, Yang C, Lin X, Wang J, Ou X, Zhang C, et al. Salt and alkaline stress induced transgenerational alteration in DNA methylation of rice (*Oryza sativa*). *Australian Journal of Crop Science*. 2012;5.
100. Bossdorf O, Richards CL, Pigliucci M. Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters*. 2008;11(2):106-15.
101. Bräutigam K, Vining KJ, Lafon-placette C, Fossdal CG, Mirouze M, Marcos JG, et al. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution*. 2013;3(2):399-415.
102. Boyko A, Blevins T, Yao YL, Golubov A, Bilichak A, Ilnytskyy Y, et al. Transgenerational Adaptation of Arabidopsis to Stress Requires DNA Methylation and the Function of Dicer- Like Proteins. *PLoS One*. 2010;5(3).
103. Kumar SV, Wigge PA. H2A.Z- Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. *Cell*. 2010;140(1):136-47.
104. Hashida SN, Uchiyama T, Martin C, Kishima Y, Sano Y, Mikami T. The temperature-dependent change in methylation of the Antirrhinum transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. *Plant Cell*. 2006;18(1):104-18.
105. Santos RS, Kruger MM, Pegoraro C, Madabula FP, Maia LC, Rombaldi CV, et al. Transcriptional Regulation of Seven ERFs in Rice Under Oxygen Depletion and Iron Overload Stress.(Report). *Tropical Plant Biology*. 2013;6(1):16.
106. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5. ed. New York: Garland Science; 2007. 1392 p.
107. Burd CG, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*. 1994;265(5172):615.
108. Owttrim GW. RNA helicase and abiotic stress. *Nucleic Acids Research*, v 34, p 3220-3230, 2006. 2006:3220-30.
109. Jankowsky E, Bowers H. Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DEXH/ D RNA helicases. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(15):4181.
110. Lewis JD, Izaurflde E. The Role of the Cap Structure in RNA Processing and Nuclear Export. *European Journal of Biochemistry*. 1997;247(2):461-9.
111. Hao S, Baltimore D. RNA splicing regulates the temporal order of TNF- induced gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(29):11934.

112. Nagasaki H, Arita M, Nishizawa T, Suwa M, Gotoh O. Species- specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes. *Gene*. 2005;364:53-62.
113. Ner-Gaon H, Leviatan N, Rubin E, Fluhr R. Comparative cross- species alternative splicing in plants. *Plant Physiology*. 2007;144(3):1632-41.
114. Ner-Gaon H, Halachmi R, Savaldi-Goldstein S, Rubin E, Ophir R, Fluhr R. Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 2004;39(6):877-85.
115. Kim E, Magen A, Ast G. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(1):125.
116. Ner-Gaon H, Fluhr R. Whole-genome microarray in Arabidopsis facilitates global analysis of retained introns. *DNA Research*. 2006;13(3):111-21.
117. Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes and Genetic Systems*. 2006;81(2):77-91.
118. Li J, Li X, Guo L, Lu F, Feng X, He K, et al. A subgroup of MYB transcription factor genes undergoes highly conserved alternative splicing in Arabidopsis and rice. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57(6):1263.
119. Mastrangelo AM, Belloni S, Barilli S, Ruperti B, Di Fonzo N, Stanca AM, et al. Low temperature promotes intron retention in two e- cor genes of durum wheat. *Planta*. 2005;221(5):705-15.
120. Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA, Smith CW. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alter-native splicing leading to nonsense-mediated decay. *Molecular Cell*. 2004.
121. Wang BB, Brendel V. Genome wide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;7175-80.
122. Colgan DF, Manley JL. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & Development*. 1997;11(21):2755.
123. Gott JM, Emeson RB. Functions and mechanisms of RNA editing. *Annual Review of Genetics*. 2000:499.
124. Yuan H, Liu D. Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA editing, plant development, and responses to abiotic stresses in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 2012;70(3):432-44.
125. Xu XM, Meier I. The nuclear pore comes to the fore. *Trends in Plant Science*. 2008;13(1):20-7.
126. Cole CN, Scarcelli JJ. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006;18(3):299-306.

127. Mosammaparast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear- transport mediators to nuclear- function regulators. *Trends in Cell Biology*. 2004;14(10):547-56.
128. Harel A, Forbes DJ. Importin Beta: Conducting a Much Larger Cellular Symphony. *Molecular Cell*. 2004;16(3):319-30.
129. Damelin M, Silver PA, Corbett AH. Nuclear protein transport. *Methods in Enzymology*. 2002;351:21.
130. Dong C-H, Hu X, Tang W, Zheng X, Kim YS, Lee B-h, et al. A Putative Arabidopsis Nucleoporin, AtNUP160, Is Critical for RNA Export and Required for Plant Tolerance to Cold Stress. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(24):9533.
131. Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*. 2007;12(7):301-9.
132. Scott MH, Emily B, David B, Gregory JH. An RNA- directed nuclease mediates post- transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293.
133. Ma XR, Kim EJ, Kook I, Ma FR, Voshall A, Moriyama E, et al. Small Interfering RNA- Mediated Translation Repression Alters Ribosome Sensitivity to Inhibition by Cycloheximide in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. 2013;25(3):985-98.
134. Phillips JR, Dalmay T, Bartels D. The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Letters*. 2007;581(19):3592-7.
135. Zhang BH, Pan XP, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*. 2006;46(2):243-59.
136. Bari R, Pant BD, Stitt M, Scheible WR. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate- signaling pathway in plants. *Plant Physiology*. 2006;141(3):988-99.
137. Jen C-h, Michalopoulos I, Westhead DR, Meyer P, Jen C-H. Natural antisense transcripts with coding capacity in *Arabidopsis* may have a regulatory role that is not linked to double- stranded RNA degradation. *Genome Biology*. 2005;6(6):R51-R.
138. Wang X-j, Gaasterland T, Chua N-h, Wang X-J, Chua N-H. Genome- wide prediction and identification of cis- natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*. 2005;6(4):R30.
139. Zhang XM, Xia J, Lii YFE, Barrera-Figueroa BE, Zhou XF, Gao S, et al. Genome-wide analysis of plant nat- siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biology*. 2012;13(3).
140. Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Crosatti C, Guerra D, Stanca AM, Cattivelli L. Abiotic stress response in plants: When post- transcriptional and post- translational regulations control transcription. *Plant Science*. 2008;174(4):420-31.
141. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(3):169.
142. Mazzucotelli E, Belloni S, Marone D, De Leonardis A, Guerra D, Di Fonzo N, et al. The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation. *Current Genomics*. 2006;7(8):509-22.

143. Sadowski M, Suryadinata R, Tan AR, Roesley SNA, Sarcevic B. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life*. 2012;136-42.
144. Ellis C, Turner JG, Devoto A. Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens. *Plant Molecular Biology*. 2002;50(6):971-80.
145. Zhang YY, Xie Q. Ubiquitination in abscissic acid-related pathway. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007;87-93.
146. Zang X, Komatsu S. A proteomics approach for identifying osmotic- stress- related proteins in rice. *Phytochemistry*. 2007;68(4):426-37.
147. Dooki AD, Mayer-Posner FJ, Askari H, Zaiee AA, Salekdeh GH. Proteomic responses of rice young panicles to salinity. *Proteomics*. 2006;6(24):6498-507.
148. Pandey A, Chakraborty S, Datta A, Chakraborty N. Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008;7(1):88-107.
149. Gingerich DJ, Gagne JM, Salter DW, Hellmann H, Estelle M, Ma L, et al. Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/ tramtrack/ bric-a- brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin- protein ligases (E3s) in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(19):18810.
150. Pedmale UV, Liscum E. Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1- interacting protein NPH3. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(27):19992.
151. Bossis G, Melchior F. SUMO: regulating the regulator. *Cell Division*. 2006;1(1):13.
152. Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOI1 complex during jasmonate signalling. *Nature*. 2007;448(7154):661.
153. Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng CX, Robinson CV, Estelle M, et al. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*. 2007;446(7136):640-5.
154. Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, et al. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellins. *The Plant Cell*. 2007;2140-55.
155. Hay RT. SUMO: A History of Modification. *Molecular Cell*. 2005;18(1):1-12.
156. Melchior F, Schergaut M, Pichler A. SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends in Biochemical Sciences*. 2003;28(11):612-8.
157. Catala R, Ouyang J, Abreu IA, Hu Y, Seo H, Zhang X, et al. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *The Plant Cell*. 2007;19(9):2952-66.
158. Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, et al. The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(21):7760-5.

159. Yoo CY, Miura K, Jin JB, Lee J, Park HC, Salt DE, et al. SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermo tolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid. *Plant Physiology*. 2006;1548-58.

160. Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirm V, Miura T, et al. SIZ1- mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/ DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2007;19(4):1403-14.

161. Kovalchuk I, Zemp FJ. *Plant Epigenetics: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press; 2010.

162. Vancura A. *Transcriptional Regulation: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press; 2011. 605 p.

163. Collas P. *Chromatin Immunoprecipitation Assays: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press; 2009. 268 p.

164. Gruntman E, Qi Y, Slotkin RK, Roeder T, Martienssen RA, Sachidanandam R. Kismeth: Analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. (Software) (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth>). *BMC Bioinformatics*. 2008;9(371):371.

165. Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K. 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010;13(2):132-8.

18

CAPÍTULO

PLANTAS TRANSGÊNICAS: FUNDAMENTOS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO E APLICAÇÕES

Andrea Soares-Costa
Vanessa Karine Schneider
Darlan Gonçalves Nakayama
Ariel D. Arencibia
Flavio Henrique-Silva

18.1 INTRODUÇÃO

As plantas transgênicas são organismos geneticamente modificados, ou seja, passam por um processo de transferência de um ou mais genes de um organismo para o vegetal sem que ocorra fecundação. Esse processo é denominado transformação genética de plantas. Os vegetais transformados geneticamente são chamados de transgênicos. Essa tecnologia advém de uma área específica chamada biotecnologia vegetal.

O termo biotecnologia foi utilizado pela primeira vez, em 1919, pelo húngaro Karl Ereky, que o definiu como sendo a aplicação de técnicas biológicas em organismos vivos, para obtenção de um produto, processo ou serviço

para fins práticos ou industriais¹. Esta tecnologia pode englobar abordagens variadas, desde a utilização de micro-organismos fermentadores para a produção de alimentos e bebidas (pães, cerveja, vinho e outros) como é realizado há milhares de anos, até abordagens mais contemporâneas de manipulação genética que resultem, por exemplo, na produção de plantas transgênicas para produção de proteínas recombinantes de interesse farmacológico. Desta maneira, a Biotecnologia Vegetal é uma área que engloba procedimentos que permitem a manipulação de plantas para obtenção de novas características de interesse agrícola ou a sua utilização para obtenção de produtos ou a realização de determinadas funções.

Com a elucidação da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953², a biotecnologia passou a atuar no campo da genética molecular. Em 1969, a descoberta das endonucleases de restrição³, que são enzimas capazes de reconhecer uma pequena sequência de pares de bases no DNA e então clivar neste sítio de reconhecimento, tornou possível a manipulação do material genético. Em 1973, Stanley Cohen e Herbert Boyer, considerados os inventores da tecnologia do DNA recombinante, realizaram, pela primeira vez, a recombinação de moléculas de DNA de diferentes espécies *in vitro*⁴. Surgia então a engenharia genética, sendo que o primeiro produto derivado de um organismo transgênico chegaria ao mercado em 1982. Tratava-se da insulina, produzida por uma linhagem de *Escherichia coli* geneticamente modificada com um gene humano⁵.

A tecnologia do DNA recombinante permitiu aos cientistas identificar e inserir, no genoma de um determinado organismo, um ou mais genes responsáveis por características particulares ao invés de promover o cruzamento entre organismos relacionados, como ocorre no melhoramento clássico, onde o melhorista é obrigado a trabalhar com genomas inteiros. O melhoramento genético clássico é baseado em cruzamentos entre espécies sexualmente compatíveis, de modo a selecionar as características desejadas quando observadas na progênie, estando, entretanto, limitado às características já existentes. Antes do advento da engenharia genética, só era possível selecionar recombinações que ocorriam ao acaso entre os blocos gênicos dos cromossomos dos genitores. Este processo pode levar muito tempo até atingir os resultados esperados e, frequentemente, as características de interesse podem não estar presentes na próxima geração. A biotecnologia vegetal proporcionou uma redução no tempo para obtenção de novas variedades de plantas, além de permitir a transferência de características entre espécies que normalmente são sexualmente incompatíveis.

As primeiras plantas transgênicas foram obtidas em 1983 por quatro grupos de investigação distintos: o grupo do cientista M. D. Chilton da

Universidade de Washington que transformou células de uma variedade de tabaco, *Nicotiana plumbaginifolia*, utilizando um gene quimérico para conferir resistência ao antibiótico canamicina; o grupo de J. Schell da Universidade de Gent na Bélgica, que regenerou plantas de tabaco resistentes ao metrotexato e a canamicina; o grupo da Universidade de Wisconsin, liderados por J. Kemo e T.Hall que transformaram plantas de girassóis; e o grupo da empresa Monsanto que obtiveram plantas de petúnias transformadas com um gene quimérico que conferia resistência a canamicina⁶.

Do ponto de vista agrônomo, estas plantas possuíam um potencial limitado, porém o estudo demonstrou ser possível a transferência de genes de outros organismos para as plantas, transpondo as barreiras genéticas, e que estes genes eram funcionalmente estáveis quando integrados no genoma das células vegetais. Somente 11 anos mais tarde, em 1994, a primeira variedade de planta geneticamente modificada (PGM) seria liberada para cultivo e comercialização pela Food and Drug Administration (FDA), a autoridade de segurança alimentar dos Estados Unidos: o tomate *Flavr savr*®. Este apresentava no seu genoma a inserção do gene codificador da poligalacturonase (do próprio tomate) no sentido antissenso. Esta enzima está envolvida na degradação de elementos pécticos da parede celular e consequentemente no processo de amadurecimento do fruto. A produção de um RNA anti-senso na planta transgênica resultou na redução da expressão desta enzima e o consequente atraso no processo de maturação⁷.

Atualmente, já existe uma grande variedade de plantas geneticamente modificadas e estas plantas têm como principais características uma maior tolerância a herbicidas e pesticidas, maior resistência a um determinado tipo de fator, seja ele biótico (insetos-praga, ervas daninhas, agentes patogênicos) ou abiótico (acúmulo de poluentes no solo, *stress* hídrico e salino), com o objetivo de reduzir o dano nas culturas e consequentemente aumentar o rendimento dos agricultores. Todavia, o potencial de transformação genética das plantas vai além do melhoramento das características de importância agrônoma, permitindo também sua utilização como biofábricas para a produção de compostos com aplicações na indústria farmacêutica ou até mesmos gêneros alimentícios com maior valor nutritivo ou que possuam período prolongado de comercialização⁶.

O número de plantas transgênicas autorizadas para cultivos em larga escala, seja pela sua importância agrícola ou industrial é muito reduzido quando comparado aos estudos com PGMs obtidas em condições laboratoriais. Isso se deve a inúmeros fatores, que incluem dificuldades técnicas em se obter as PGMs; elevados investimentos e altos riscos; a normalização sob

as severas leis de biossegurança em relação aos produtos transgênicos (que acabam por limitar a disponibilização das PGMs e de seus produtos derivados tanto no campo quanto para fins comerciais)⁶.

Apesar destas limitações, verificou-se um aumento consistente dos cultivos de plantas transgênicas pelo mundo desde que as primeiras PGMs foram autorizadas. Segundo os últimos dados fornecidos pela ISAAA, *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*, relativos a 2012, as principais plantas transgênicas cultivadas são a soja, o milho, o algodão e a canola, cujas principais características relacionam-se a sua tolerância a herbicidas e/ou resistência a insetos-praga⁸.

Em 2012, cerca de 170 milhões de hectares de PGMs foram cultivados mundialmente. O Brasil ocupa o segundo lugar em hectares de PGMs cultivados, com 36,6 milhões de hectares, o que equivale a 21% de toda área cultivada, estando atrás apenas dos EUA, com 61,2 milhões (36%)⁸. Nosso país já aprovou a primeira soja resistente a insetos-praga e tolerante a herbicidas para comercialização em 2013 e notadamente a Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, obteve a aprovação perante a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para comercializar um feijão geneticamente modificado resistente ao vírus da doença conhecida como mosaico dourado⁹. A expectativa da Embrapa é que o feijão transgênico chegue às mãos dos agricultores em 2014.

A transformação genética é a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor por um processo assexual¹⁰. O sucesso da produção de PGMs depende da introdução do DNA no genoma vegetal e da regeneração de plantas que expressam o gene inserido¹¹. Vários métodos para a transferência de genes em plantas têm sido propostos e atualmente protocolos podem ser encontrados na literatura científica para a transformação das plantas de maior importância agrônômica no mundo^{12,13}. O estabelecimento de uma estratégia eficiente para a transferência de genes é fundamental para o sucesso de todo o processo¹⁴.

18.2 MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

18.2.1 Método de transferência indireta via *Agrobacterium*

A transferência indireta de genes necessita de um vetor para intermediar o processo de transformação. O biólogo molecular Luis Herrera-Estrela e o

geneticista Robert B. Horsh foram os pioneiros a transformar com sucesso plantas de tabaco com *Agrobacterium*, demonstrando que esta bactéria poderia servir como um vetor natural para a transformação de vegetais, possibilitando a transferência de genes de interesse biotecnológico para as plantas transformadas¹².

Este processo foi desenvolvido com base na *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria tipicamente de solo, gram-negativa, pertencente à família Rhizobiaceae, que infecta naturalmente células vegetais lesionadas (lesões causadas por práticas agrícolas, geadas ou atividade de organismos como insetos, mamíferos e nematoides). A bactéria transfere um fragmento de DNA que se integra no genoma das células hospedeiras¹⁵. Esse DNA é chamado de T-DNA, e contém genes envolvidos na produção de reguladores de crescimento vegetal e opinas. O DNA transferido é integrado no genoma das células vegetais hospedeiras e passa a ser expresso alterando o padrão normal de expressão, sendo responsável pela manifestação de uma doença denominada “*crown gall*” ou galha-da-coroa¹⁶. Esta doença caracteriza-se pela proliferação anômala de células na zona de contato entre o caule e a raiz, originando uma espécie de tumor vegetal (galha). Foi demonstrado que a formação das galhas induzidas por *Agrobacterium tumefaciens* estava diretamente associada à presença de um plasmídeo de alto peso molecular (120 kb a 250 kb), denominado plasmídeo *Ti* (do inglês *Tumor inducing*) (Figura 18.1).

Análises moleculares permitiram identificar duas regiões do plasmídeo *Ti* que estão diretamente envolvidas no processo de indução tumoral: a região-T, que corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal durante o processo infeccioso, e a região de virulência (região *vir*), que contém operons co-regulados responsáveis pelo controle dos processos de separação da região-T do plasmídeo *Ti*, seu transporte e integração no genoma das células vegetais¹⁷.

A região-T encontra-se situada entre duas extremidades (esquerda e direita), que são curtas sequências repetitivas de 25 pares de bases, que quando integrada no genoma da célula vegetal, passa a ser chamada de T-DNA (do inglês “*transferred DNA*”). O T-DNA possui genes responsáveis pela síntese de opinas e de hormônios reguladores de crescimento (auxinas e citocininas). As opinas são compostos formados pela condensação de aminoácidos ou açúcares modificados que servem como fonte de nutrientes que são exclusivamente catabolizadas por sua linhagem indutora, conferindo assim uma vantagem seletiva a esta estirpe. A expressão destes genes interfere no padrão de expressão das células transformadas, resultando na sua

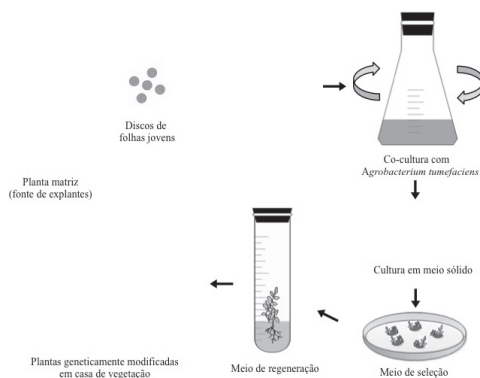


Figura 18.1 Esquema geral das etapas de transformação de plantas por co-cultura com uma linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*.

multiplicação descontrolada, culminando na formação da galha, ou tumor, nos locais infectados do vegetal^{18,19}.

O primeiro passo no processo de infecção das plantas pela *Agrobacterium tumefaciens* é a liberação pelas células vegetais lesionadas de moléculas (essencialmente compostos fenólicos, aminoácidos e monossacarídeos) que atraem quimiotaticamente as bactérias para o local da lesão¹⁸. A ligação entre bactérias e tecido danificado é estabilizada pela formação de filamentos de celulose pelas bactérias propiciando uma melhor fixação das células hospedeiras. Esta ligação é fundamental para o início do processo de infecção, visto que, sem este contato a transferência do T-DNA seria inviável.

Estando a ligação inicial estabilizada, as moléculas-sinal exsudadas em resposta ao ferimento no vegetal também irão ativar a expressão dos genes de virulência que estão localizados na região *vir* do plasmídeo *Ti*. Esta região possui um conjunto de operons co-regulados pelas mesmas proteínas onde as unidades transcricionais denominadas *vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E* e *vir G* estão localizadas adjacente a extremidade esquerda do T-DNA²⁰. Estes genes codificam enzimas que são responsáveis pelo processamento, excisão, transferência e proteção do T-DNA contra nucleases da célula vegetal. Primeiramente uma molécula de T-DNA cadeia única é excisada do plasmídeo *Ti* para ser incorporada nas células vegetais. Esta molécula de T-DNA é envolvida por proteínas sintetizadas pelo complexo policistrônico *vir*, cuja função é proteger o T-DNA contra a ação de nucleases durante o processo de transporte até o núcleo da célula vegetal. Até sua inserção no DNA das

células das plantas, o T-DNA atravessa uma série de barreiras físicas (membranas interna e externa da bactéria a parede celular, membrana celular e nuclear das células vegetais). Varias proteínas sintetizadas pela região *vir* estão associadas à formação de um canal de transferência associado a um sistema de conjugação (formação de um *pillus* de conjugação) que possibilita que o transporte do T-DNA ocorra²¹. Muitas destas proteínas sintetizadas pela região *vir* possuem função estrutural enquanto outras parecem ser importantes nos processos de interação e reconhecimento de receptores nas células vegetais⁶. O processo de integração do T-DNA no genoma das células vegetais é controlado por uma diversidade de fatores. Alguns aspectos do processo de infecção já foram compreendidos, porém ainda existem diversas lacunas a se preencher para a sua completa elucidação.

A preparação de uma linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* para ser utilizada como vetor de transformação de plantas exige primeiramente que ela esteja “desarmada”, isto é, sem a presença dos oncogenes presentes no T-DNA original. A deleção dos oncogenes se dá por meio de um processo de dupla recombinação em que um vetor contendo regiões de homologia como T-DNA é introduzido na agrobactéria. Este vetor se integra ao plasmídeo *Ti*, causando uma deleção. Os plasmídeos desarmados recombinantes são selecionados por apresentarem uma marca de resistência enquanto a região deletada, contendo os oncogenes, não se mantém na bactéria por não apresentar uma origem de replicação²². Numa segunda etapa, no local dos genes retirados serão inseridos os genes de interesse e/ou marcadores de seleção, que serão integrados no genoma da planta tida como hospedeira^{23,24,25}. Devido ao seu tamanho (120 kb a 250 kb), o plasmídeo *Ti* não pode ser manipulado diretamente, exigindo a utilização de vetores menores, mais fáceis de se manipular. Estes vetores possuem as extremidades do T-DNA entre as quais os genes de interesse serão clonados e podem ser de dois tipos: binários ou co-integrados. Vetores binários são aqueles capazes de se replicarem tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*, e se mantém de forma independente do plasmídeo *Ti*^{26,27}. Os vetores co-integrados são originados a partir de vetores intermediários, que apresentam uma origem de replicação do tipo ColE1, que se replicam em *E. coli* mas não em *Agrobacterium*. Ocorre uma recombinação homóloga entre o vetor intermediário e o T-DNA da linhagem desarmada por apresentarem regiões de homologia, gerando um vetor cointegrado²³. Em uma última etapa, o vetor, binário ou co-integrado, deve ser transferido para a linhagem desarmando de *Agrobacterium* o que pode ser feito por métodos de transformação via conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico.

Protocolo de transformação genética via *Agrobacterium*

Um dos protocolos mais utilizados na transformação genética de plantas envolve a co-cultura de explantes com potencial regenerativo com cepas de *Agrobacterium* possuidoras do vetor de transformação, o qual possui o gene de interesse e/ou marcadores de seleção (Figura 18.2). Neste protocolo é necessário que a cultura de agrobactérias que possui o vetor em questão fique em contato com explantes com potencial regenerativo (como segmentos de folhas jovens, embriões zigóticos, entrenós, etc) em um meio de cultura sem qualquer agente seletivo para que as bactérias possam se manter e iniciar o processo de transferência e integração do T-DNA no genoma vegetal²⁸.

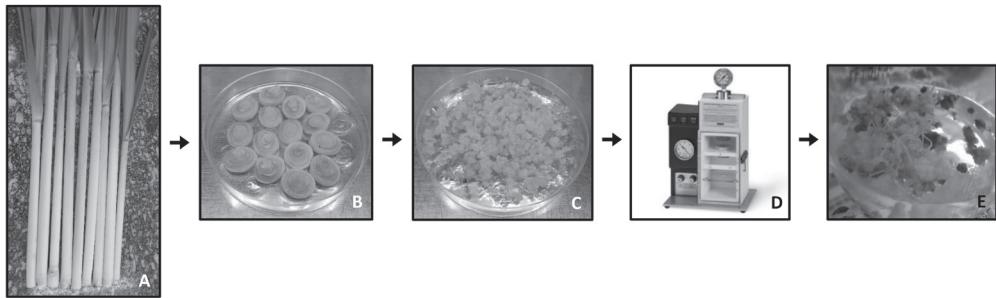


Figura 18.2 Etapas de transformação de cana-de-açúcar via biolística. (A) Extremidades de plantas de cana-de-açúcar que darão origem aos explantes. (B) Discos de folhas jovens de cana-de-açúcar. (C) Calos embriogênicos de cana-de-açúcar produzidos por meio de sub-cultivos dos discos foliares em meio contendo reguladores de crescimento. (D) Bombardeamento de partículas contendo DNA adsorvido utilizando o equipamento – Biolistic® PDS-100/He Bio Rad. (E) Regeneração de calos embriogênicos transformados.

A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido frequentemente aplicada por não requerer uso de calos embriogênicos ou de um sistema complexo de regeneração a partir de protoplastos²⁹. Todavia, verificou-se que o uso de calos embriogênicos obtidos a partir de explantes com potencial regenerativo, têm se mostrado muito mais eficientes para a transformação de espécies que dificilmente seriam suscetíveis a esta técnica como cana-de-açúcar, soja, cassavas, entre outras.

A seguir o tecido ou calos são cultivados em meio de regeneração contendo antibiótico para eliminação das agrobactérias e um agente seletivo para plantas, geralmente genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas. Finalmente é necessário que as células transformadas sejam induzidas a formarem plantas. Dessa maneira, o meio de cultura deve conter combinações hormonais adequadas para a regeneração e indução de organogênese ou de embriogênese somática. As plantas transformadas são regeneradas *in vitro* e logo em seguida aclimatadas em casa de vegetação²⁸.

Apesar desta técnica ser muito eficiente para transformar plantas dicotiledôneas como tomate, batata, tabaco, cenoura, *Arabidopsis thaliana*, ela é limitada para monocotiledôneas. As plantas monocotiledôneas não são consideradas hospedeiras naturais para a infecção com *Agrobacterium tumefaciens*³⁰. No entanto, nos últimos anos foram desenvolvidos protocolos eficazes de transformação de monocotiledôneas utilizando agrobactérias. Embriões zigóticos imaturos de arroz³¹ e milho^{32,33} foram transformados eficientemente, tecidos transgênicos de trigo foram produzidos a partir do cocultivo de embriões com *Agrobacterium tumefaciens*³⁴ e, calos embriogênicos de cana-de-açúcar também foram obtidos a partir da técnica de cocultivo³⁵, dentre outros.

18.2.2 Método de transferência via biolística

O método de transformação genética via biolística (balística biológica – biobalística) foi descrito por Sanford em 1987. É conhecido por método de microprojéteis, aceleração de partículas ou biolística e consiste na aceleração de partículas carregadas com DNA, RNA ou proteínas a uma velocidade que permita a passagem das mesmas através da parede celular e membranas, de modo não letal³⁶. As partículas alojam-se aleatoriamente no interior da célula e, então, o DNA é dissociado e integrado ao genoma do receptor³⁷.

A biolística é um método de transformação simples e rápido, que permite a transferência de genes para numerosas células e tecidos, sendo necessário apenas um único aparelho para todos os bombardeamentos³⁸. Além de células vegetais, a biolística também pode ser utilizada para a introdução de genes em fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos e em tecidos de animais³⁷.

Nos primeiros experimentos realizados, foram testados diferentes dispositivos de aceleração: descarga de gás, impulso mecânico, macroprojétil e placa parada, sistema de aceleração centrípeta e também campos eléctricos. Todos estes mecanismos de aceleração foram eficazes para a aceleração

de microprojéteis a velocidades suficientes para permitir a penetração das partículas nas células³⁶. Porém, o método foi melhorado e, atualmente o procedimento utiliza a pressão do gás hélio para acelerar as micropartículas revestidas com DNA a diferentes velocidades para transformar de modo eficiente diferentes tipos de células. O bombardeador consiste basicamente em uma câmara de bombardeamento, uma tubulação conectora à fonte de vácuo, regulador de hélio, válvula solenoide e tubos conectivos. A pressão do gás é liberada pela ruptura de um disco (disco de ruptura), e, então, um macrocarreador, contendo um disco com as partículas e DNA precipitados, é impulsionado a uma curta distância até uma tela de parada, de onde as micropartículas passam e atingem as células. Durante a operação, é formado vácuo, para reduzir o atrito das partículas com o ar, evitando desvios e redução de velocidade⁴⁰.

Os parâmetros de pressão do gás hélio, vácuo, distância do disco de ruptura e o macrocarreador, distância do disco microcarreador até a tela de bloqueio e também a distância entre a tela de bloqueio e as células alvo podem ser ajustados, para transformar eficientemente diferentes tipos de células⁴⁰.

As micropartículas utilizadas são geralmente de ouro ou tungstênio. As partículas de ouro são consideradas biologicamente inertes, mas seu custo é elevado, enquanto partículas de tungstênio são tóxicas para alguns tipos de células, embora o custo seja reduzido⁴¹. O diâmetro das micropartículas varia de acordo com a célula alvo, estando entre 0,2 a 4 μm ³⁷.

Protocolo de transformação genética de plantas por biolística

Com o objetivo de servir como guia geral, esta seção descreve brevemente um protocolo para a transformação genética de calos embriogênicos de cana-de açúcar via biolística, visando obter plantas transgênicas⁴¹.

Os passos para a obtenção de uma planta transgênica são: (1) isolamento e clonagem de um gene de interesse; (2) transferência do gene de interesse para a célula vegetal; (3) regeneração das plantas transformadas; (4) análise e expressão do gene introduzido nas plantas regeneradas.

- **Passo 1:** Isolamento e clonagem de um gene de interesse. A fase aberta de leitura que codifica uma proteína de interesse é obtida por meio de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene. O produto de amplificação é então clonado em um vetor para expressão em plantas.

- **Passo 2:** Transferência do gene de interesse para a célula vegetal. O plasmídeo para expressão em plantas contendo o gene de interesse será introduzido nas células vegetais. As células vegetais que serão utilizadas no bombardeamento são geralmente oriundas de plântulas crescidas em casa de vegetação. Posteriormente, são realizados cortes transversais de 3 mm no cartucho de folhas jovens (palmito) situado 10 cm acima do meristema apical e estes cultivados em meio de cultura Cl-3 (meio Murashige e Skoog suplementado com 5% de água de coco, 6-Benzilageninopurina (BAP), 35ml/L de antibiótico gentamicina e 8g/L de ágar para solidificação), acrescido de hormônio indutor de calogênese e antibiótico para evitar eventuais contaminações. Estes explantes são mantidos em placas de Petri em sala de crescimento, no escuro, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por trinta dias, quando a primeira repicagem é realizada. Os calos são repicados a cada três semanas. Entre os calos que se desenvolvem, serão selecionados os que apresentam potencial embriogênico para o bombardeamento das micropartículas com o DNA recombinante. Para o bombardeamento, as micropartículas de tungstênio são preparadas com a precipitação do vetor contendo o gene de interesse utilizando CaCl_2 e espermidina associados com as partículas.

Para o bombardeamento, utilizou-se partículas de tungstênio (1,2 μm de diâmetro) envolvidas com o DNA transformante de acordo com o método descrito por³⁶. Cerca de 5 μg do DNA plasmidial (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) são co-precipitados junto a partículas de tungstênio acrescidas de espermidina (0,1M) e cloreto de cálcio (2,5M)⁴². Essa mistura é centrifugada e o pellet lavado duas vezes com etanol 95% e ressuspendido em etanol 100%. Dois microlitros da suspensão obtida serão utilizados no bombardeamento de uma placa de Petri contendo os calos embriogênicos posicionados no centro da mesma. Utilizou-se a pressão recomendada pelo fabricante do equipamento, neste caso, 784.5 kPa, para um equipamento PDS-1000/He, da BioRad).

- **Passo 3:** Regeneração das plantas transformadas. Após o bombardeamento das células vegetais, os calos embriogênicos transformados devem ser transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura MS e mantidos em sala de crescimento. Após 10 dias os calos serão transferidos para um novo meio de cultura Cl-3 contendo o antibiótico para seleção das células transformadas com o plasmídeo. Estes calos serão mantidos em sala de crescimento a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas para a regeneração dos transformantes durante um período de três meses até serem obtidas as primeiras plantas com raízes.

- **Passo 4:** Análise da integração e expressão do gene de interesse. Pequenos fragmentos de folhas deverão ser coletados para extração de DNA, RNA e proteínas, a fim de se realizar a análise de integração e expressão do gene de interesse no genoma das plantas. Estas análises podem ser realizadas via PCR, *Southern blotting* e *Western blotting*.

18.2.3 Método de transferência via eletroporação de protoplastos

O método de transformação genética de protoplastos vegetais via eletroporação foi desenvolvido por Fromm e colaboradores em 1995. Ele se baseia na transferência de genes para as células por meio de um pulso elétrico curto de alta voltagem é aplicado a uma solução que contém DNA e protoplastos (células cuja parede celular foi removida). Devido ao pulso elétrico de alta voltagem, há indução da formação de poros na membrana da célula, o que permite a passagem do DNA para o seu interior⁴³. O pulso elétrico não deve ser muito intenso, pois a formação de poros acaba sendo irreversível, o que impede a regeneração das células⁴⁴.

No trabalho desenvolvido por Fromm, foram utilizados protoplastos de cenoura, pois são facilmente isolados e obtidos em grande quantidade. O gene utilizado codifica a enzima cloranfenicolacetiltransferase (CAT). A eficiência de transferência do gene foi diretamente influenciada pela concentração de DNA, amplitude e duração do pulso elétrico e composição do tampão de eletroporação. A técnica foi eficiente para transformar tabaco e milho, mostrando que pode ser utilizada tanto para mono quanto para dicotiledôneas⁴³.

18.3 GENES MARCADORES

A transformação genética vegetal implica não apenas na transferência de um gene específico para a planta, mas também na transferência de outros elementos que estão relacionados desde a eficácia do processo de expressão recombinante deste gene a identificação e/ou seleção das plantas transformadas. São denominados genes marcadores aqueles responsáveis pela síntese de fatores que permitam a identificação ou seleção das células transformadas. Os genes marcadores podem ser de dois tipos: genes repórteres ou genes de seleção^{6,10}.

Genes repórteres codificam proteínas cuja presença ou atividade enzimática são facilmente detectáveis e mensuráveis denotando a condição transgênica das células, tecidos ou organismos transformados. Existem diversos tipos de genes repórteres. Nas plantas os mais utilizados são o gene *uidA* ou *GUS*, isolado de *Escherichia coli* e que codifica a enzima β -glucuronidase, o gene da proteína GFP (do inglês *Green Fluorescent Protein*) e com uma frequência menor, genes envolvidos na síntese de antocianinas, genes envolvidos na síntese de opinas e genes das luciferases, que catalisam reações que liberam luz (genes *lux* e *luc*).

A grande aceitação do gene *uidA* ou *GUS* como gene marcador em plantas decorre da simplicidade e versatilidade do método para detecção de sua atividade enzimática e do fato das plantas não apresentarem atividade endógena significativa⁴⁵. O produto da enzima β -glucuronidase pode ser detectado por meio de ensaios histoquímicos e fluorimétricos⁴⁶. O ensaio histoquímico é um método qualitativo, onde primeiramente os explantes transformados são imersos no substrato chamado X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucoronídeo), onde na presença da enzima β -glucuronidase forma um precipitado de coloração azulada, permitindo a localização visual do local da expressão do gene⁴⁷. Uma das limitações da técnica reside no fato dos ensaios histoquímicos e fluorimétricos serem destrutivos, não possibilitando a recuperação do material *in vivo*⁴⁸.

A GFP é uma proteína constituída de 238 aminoácidos produzida pelos cnidários *Aequorea victoria* e *Renilla reniformis* que, quando submetida a radiação ultra-violeta emite uma fluorescência no campo visual correspondente a coloração verde⁴⁹. Recentemente, a utilização do gene da GFP como gene repórter tornou-se o método mais eficiente para avaliar a expressão de genes em ensaios de transformação gênica. Nos ensaios de detecção, a fluorescência pode ser mensurada sem que seja necessário adicionar qualquer substrato, sendo necessário apenas um comprimento de onda adequado e oxigênio. A GFP pode ser ligada a proteínas de interesse, formando proteínas de fusão⁴⁹ sem que seja alterada suas propriedades fluorescentes ou a função biológica da proteína em questão⁵⁰. Como sua atividade pode ser monitorada *in vivo*, estas proteínas fluorescentes são comumente utilizadas para determinar a localização e dinâmica de proteínas, assim como para avaliar a capacidade de expressão de diferentes promotores. Devido a sua aplicabilidade esta proteína tem sido alvo de muitos estudos que visam a obtenção de GFPs modificadas no que diz respeito aos seus picos de excitação, luminosidade e níveis de expressão⁵¹.

A utilização de genes de seleção associados ao gene de interesse a ser incorporado nas células vegetais tornou-se imprescindível já que eles

possibilitam a seleção das células que de fato incorporaram o gene preterido. O princípio do uso dos genes de seleção é baseado na capacidade destes conferirem uma característica adequada a um processo de seleção artificial. Estes marcadores na maioria das vezes são genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas, permitindo a sobrevivência somente das células vegetais que possuem esta marca de resistência e eliminando as células sensíveis. O processo de seleção dos transformantes pode ser realizado por meio da inclusão de antibióticos ou herbicidas no meio de cultura ou via pulverização das plantas que foram transformadas.

Entre os genes que conferem resistência a antibióticos mais usados em vetores de transformação de células vegetais destacam-se o da neomicina fosfotransferase II (*nptII*) e o gene da higromicina fosfotransferase (*hpt*). O gene *nptII* confere resistência à neomicina e seus análogos estruturais, como a canamicina, gentamicina (418) e paramomicina¹². O gene *hpt* confere resistência ao antibiótico higromicina B. Este antibiótico é mais tóxico do que a canamicina podendo ser utilizado em concentrações menores⁵².

Dentre os genes que conferem resistência a herbicidas destacam-se o gene da fosfinotricina-acetiltransferase (*ppt*, *pat* ou *bar*) e o gene da 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (*aroA* ou *epsps*). O gene *ppt*, *bar* ou *pat*, isolados de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica a enzima fosfinotricina-acetiltransferase (PAT) que acetila o grupo amino livre do herbicida fosfinotricina (PPT) impedindo sua ligação com a enzima glutamina-sintase. O herbicida PPT ao inibir a enzima glutamina-sintase, ocasiona um acúmulo de amônia nos tecidos vegetais que é extremamente tóxicos para estas células⁵³. O gene *aroA* ou *epsps*, inicialmente isolado de *Petuniahybrida* e *Arabidopsis thaliana*, codifica uma forma da enzima 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) não inibida por glifosato, base dos herbicidas como o *Round-Up*, produzido pela Monsanto. A inibição da EPSPS resulta no acúmulo de shiquimato, que interrompe a síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) e metabolitos secundários, ocasionando a morte das células vegetais⁵⁴.

18.4 PESQUISAS RELACIONADAS A APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

As proteínas recombinantes de interesse biotecnológico são produzidas geralmente em micro-organismos e em células de mamíferos. Cada um destes sistemas oferece vantagens e desvantagens. Micro-organismos podem não

ser muito eficientes para produzir proteínas eucarióticas, ao passo que células de mamíferos possuem capacidade limitada e também um alto custo. A produção de proteínas em plantas oferece a vantagem da produção em larga escala e também permite que medicamentos, por exemplo, sejam produzidos no próprio local onde a demanda é requerida. Por isso, a produção dos mais diversos compostos e proteínas de interesse medicinal em plantas transgênicas tem se tornado uma solução atrativa. Embora o custo de desenvolvimento e crescimento de plantas transgênicas não seja tão reduzido em relação aos micro-organismos, as plantas são capazes de enovelar e montar proteínas complexas e realizar modificações pós-traducionais de modo semelhante aos mamíferos. Além disso, não apresentam endotoxinas encontradas em bactérias e não são hospedeiras de patógenos humanos, como ocorre em células de mamíferos⁵⁵. Baseado nestas premissas, o desenvolvimento de plantas transgênicas visando à produção de proteínas de interesse médico vem sendo alvo de muitas pesquisas.

A primeira proteína terapêutica humana a ser produzida em plantas foi o hormônio de crescimento humano em calos celulares de girassol e tabaco⁵⁶. Posteriormente, a albumina, tradicionalmente isolada a partir de sangue, foi produzida em tabaco e batata transgênicos⁵⁷. Desde então, uma série de proteínas de interesse medicinal tem sido produzida em plantas, sendo que em 2004, o primeiro produto recombinante produzido em plantas foi comercializado pela ProdiGene – EUA. A empresa isolou uma sequência do gene da tripsina bovina e a inseriu em plantas de milho passando, então, a produzir a tripsina em larga escala, sendo comercialmente chamada de *TrypZean®*. A tripsina é utilizada na digestão e processando proteínas, na separação de células em cultura e também como parte de formulações de detergentes e meios de cultura para bactérias. A ausência de patógenos humanos consiste na principal vantagem em se utilizar a tripsina proveniente de vegetais⁵⁸. Na próxima seção, descreveremos alguns exemplos de pesquisas realizadas em relação à produção de proteínas e compostos de interesse medicinal e industrial.

18.4.1 Produção recombinante de antígenos para vacinas em plantas

Dentre as principais aplicações de plantas transgênicas para a área da saúde, pode-se citar a produção de vacinas. Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas, tanto no enfoque da produção e purificação de antígenos

produzidos a partir de plantas quanto da administração direta de alimentos transgênicos, sem a necessidade de purificação e processamento.

Uma vacina é baseada em um antígeno que induz o organismo receptor a aumentara produzir anticorpos específicos contra uma determinada doença. Ao se produzir uma vacina em plantas, exclui-se o risco, por exemplo, de vacinas formuladas a partir da atividade patogênica atenuada ou inativada de vírus, pois para a produção recombinante do antígeno, utiliza-se somente uma porção do organismo que se acredita ser capaz de induzir a produção de anticorpos. Além disso, em relação aos métodos tradicionais de produção de antígenos em bactérias, leveduras e células de mamíferos, as plantas apresentam a vantagem da produção em larga escala, reduzido custo de produção e possibilidade de administração oral de alimentos contendo a concentração suficiente de antígenos⁵⁹.

Zheng-jun Guan e colaboradores (2010) apresentaram uma revisão de pesquisas relacionadas à produção de um antígeno em plantas transgênicas para o posterior desenvolvimento de vacinas contra a Hepatite B. Trata-se da produção de um antígeno de superfície (HBsAg) do vírus HBV, causador da hepatite B. HBsAg desempenha papel crucial na montagem e liberação do vírus completo, de forma que é utilizado na detecção da infecção e é o principal componente de vacinas preventivas. A vacina recombinante contra HBV existente é principalmente expressa em leveduras, porém o custo final é elevado e não pode ser utilizada para vacinação em larga escala. O gene que codifica o antígeno de superfície foi eficientemente integrado e expresso em tabaco, batata, tomate, banana, soja, cenoura, alface, maçã, dentre outras plantas, porém, a quantidade do antígeno HBsAg produzida é insuficiente para que ocorra imunização⁶⁰.

Um grande número de trabalhos publicados relata a produção recombinante em plantas da subunidade B da toxina da cólera. Esta toxina é produzida pela bactéria *Vibrio cholerae*, causadora da cólera, que se caracteriza por sintomas de diarreia aguda. A subunidade B da toxina não é tóxica e tem como função ligar a toxina a receptores da mucosa, sendo uma das primeiras moléculas selecionadas para a produção de vacinas contra esta doença. Foi possível verificar a expressão do gene recombinante em plantas transformadas de tabaco (*Nicotianatabacum*), tomate (*Solanumlycopersicum*) e arroz (*Oryza sativa*). De forma semelhante, há relato de produção recombinante da subunidade B de uma enterotoxina termolábel (LT) da bactéria *Escherichia coli* (ETEC), que também provoca diarreia aguda. A LT-B desempenha papel crucial na ligação da toxina aos gangliosídeos das células epiteliais. Os estudos foram realizadas inserindo o gene codificador da

LTB fusionado com outras proteínas no genoma de tabaco, batata, milho, tomate, *Arabidopsisthaliana*, soja e cenoura⁶¹. Ambas as linhas de pesquisas apresentaram resultados preliminares satisfatórios em testes de imunização em camundongos, demonstrando que, futuramente, com maior esforço em pesquisas, vacinas comerciais contra a diarreia podem ser desenvolvidas.

Segundo Tiwari e colaboradores (2009), para que a produção de um antígeno seja eficiente, deve-se observar uma série de características em relação à planta e ao tecido onde a expressão do gene heterólogo será induzida: i) o método de transformação deve ser adaptado e deve ser eficiente para a planta que se deseja trabalhar; ii) caso o antígeno seja termosensível, a planta/órgão deve ser consumida sem passar por cozimento; iii) a região da planta a ser utilizada deve ser rica em proteínas, pois a relação de concentração da proteína de interesse em relação à quantidade de proteína total será baixa, e não deve produzir moléculas tóxicas; v) a planta deve ser capaz de realizar todas as modificações pós-traducionais e o correto enovelamento das proteínas⁶¹.

18.4.2 Produção recombinante de antioxidantes em plantas

Adam Matkowski (2008) relatou a produção de antioxidantes de valor medicinal em plantas transgênicas transformadas com a bactéria *Agrobacterium rhizogenes*. A bactéria induz a proliferação de raízes secundárias, chamadas de raízes em cabeleira, o que aumenta a produção de metabólitos secundários. Muitas espécies da família Lamiaceae foram transformadas para uma maior produção de antioxidantes polifenólicos, como o ácido rosmarínico. Além disso, raízes transformadas de *Saussurea involucrata* superexpressando um gene heterólogo de uma chalconaisomerase, de uma espécie próxima, apresentaram aumento da produção da flavona apigenina. Raízes transformadas de *Fagopyrum esculentum* e de *Beta vulgaris* apresentaram uma maior concentração de rutina e betalaína, respectivamente⁶².

18.4.3 Enriquecimento de alimentos

Outra abordagem em relação à produção recombinante de produtos de valor medicinal em plantas baseia-se no enriquecimento de alimentos, ou seja, a inserção de genes que acentuam a produção de compostos benéficos à saúde humana.

Os seres humanos são capazes de sintetizar vitamina A a partir do β -caroteno ingerido e, por isso, uma quantidade suficiente de β -caroteno na alimentação ajuda a prevenir as doenças causadas por deficiência de vitamina A, principalmente a cegueira, que neste caso é chamada de cegueira noturna. Porém, em muitos países onde a população não possui acesso a uma alimentação em quantidade suficiente e rica em nutrientes, a incidência de cegueira causada pela falta de vitamina A é alta, principalmente em crianças (Xudong Ye, 2000). Para tentar resolver o problema, pesquisadores introduziram, em arroz, genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de β -caroteno: fitoenosintase (gene *psy*) e licopeno β -ciclase (gene *lcy*) de *Narcissus pseudonarcissuse*, fitoenodessaturase (gene *crtl*) proveniente da bactéria *Erwinia uredovora* e o gene *aphIV* que confere resistência a higromicina. A expressão foi direcionada para o endosperma, ou seja, a expressão ocorre nas sementes. Este arroz foi chamado de arroz dourado, devido à presença de carotenoides que conferem coloração amarelo-laranja^{63,64}. Alguns anos depois, surgiu a segunda geração do arroz dourado, no qual o gene *psy* de *Narcissus pseudonarcissuse* foi substituído pelo gene correspondente de milho. Desta forma, o arroz dourado de segunda geração passou a apresentar 23 vezes mais carotenoides do que o arroz anterior. Em relação à quantidade de β -caroteno que deveria ser ingerida por uma criança 1 a 3 anos, 1,72 g do arroz dourado de segunda geração, contendo 25 microgramas de carotenoides por grama de arroz seco, seria suficiente para suprir o equivalente a 50% da necessidade diária⁶⁴.

Pesquisas que utilizam estratégias de transgenia para aumentar o nível de β -caroteno em milho também estão sendo desenvolvidas. Cientistas introduziram os genes bacterianos CRTB (codifica a fitoenosintase) e CRTI (catalisa quatro passos da via de dessaturação de carotenoides), utilizando um promotor específico para expressão no endosperma. Como resultado, o teor de carotenoides totais aumentou para 33,6 mg/g de peso seco. Além disso, uma abordagem de transformação genética combinada foi utilizada não somente para aumentar o nível de β -caroteno, mas também no sentido de produzir outros carotenoides importantes como luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno, que também são conhecidos por apresentarem benefícios nutricionais e medicinais⁶⁵.

A ferritina é uma proteína que pode armazenar até 4.500 átomos de Fe^{3+} em sua cavidade interior. Esta proteína serve como armazenador primário do ferro em animais, mas pode desempenhar papel na prevenção de danos oxidativos causados por excesso de ferro em plantas. A superexpressão do gene codificador da ferritina de soja ou feijão em sementes de arroz resultou em um aumento de duas a três vezes na concentração de ferro em relação às plantas não transformadas. Também em arroz, aumento de seis vezes

na concentração de ferro foi obtida com a superexpressão não só do gene codificador da ferritina no endosperma, mas também do gene codificador da nicotianamina sintase de forma constitutiva. Esta enzima desempenha função importante no transporte de ferro até os grãos através do floema⁶⁵.

O nível de folato também foi acentuado por meio de engenharia genética em plantas transgênicas de tomate, arroz e milho, sendo que nesta última, a concentração de folato mais do que duplicou em relação às plantas não transformadas. O folato possui extrema importância durante o desenvolvimento neural de fetos humanos, sendo que sua deficiência acentua a incidência de defeitos no tubo neural⁶⁵.

O aumento da concentração de vitaminas também tem sido alvo de diversos estudos. A expressão constitutiva da enzima dehidroascorbato redutase em plantas transgênicas de milho duplicou o nível de vitamina C e, quando o promotor utilizado dirigiu a expressão somente para o endosperma, o aumento foi de seis vezes em relação às plantas selvagens. Além disso, cientistas produziram um milho transgênico superexpressando simultaneamente genes envolvidos na via biossintética de três vitaminas: ácido fólico, vitamina C e β – caroteno (pró-vitamina A), sendo que o conteúdo destas vitaminas aumentou 2, 6 e 169 vezes, respectivamente, nas sementes de milho transgênico em comparação às sementes não transformadas⁶⁵.

18.4.4 Produção recombinante de enzimas de aplicação terapêutica/diagnóstico em plantas transgênicas

Dentre os exemplos de enzimas humanas produzidas de forma recombinante em plantas pode-se citar a transglutaminase tecidual humana, que pode ser utilizada no diagnóstico da doença celíaca e a enzima lisossomal α -iduronidase, que possui aplicação como enzima de reposição no tratamento de mucopolissacaridose I (MPS I), ambas expressas em células de cultura BY-2 de tabaco. A enzima glucocerebrosidase foi produzida de modo recombinante em cultura de células de cenoura e é utilizada para tratamento da doença de Gaucher⁶⁶.

18.4.5 Produção recombinante de enzimas/proteínas industriais em plantas

Além de aplicações medicinais, as plantas transgênicas estão sendo cada vez mais utilizadas para a produção de enzimas e outras proteínas de alto

valor industrial. Como exemplo pode-se citar a produção de lacases de fungos, que são utilizadas para aumentar a eficiência do processamento de lignina como branqueador e anti-microbiano e também na clarificação de bebidas e tratamento de resíduos. Essas enzimas foram expressas de forma recombinante em uma variedade de micro-organismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, porém em baixas concentrações. A expressão em larga escala de lacases recombinantes em plantas de milho transgênico elevou os níveis de produção, além de poder ser extraída por meio de um procedimento simples, sem a necessidade de purificação, o que reduz o custo de produção. Além da produção de lacase, outras enzimas de interesse industrial foram produzidas em milho, como celulase, β -glucuronidase, avidina e α -amilase – produzida também em tabaco⁶⁵.

Biopolímeros de aplicação industrial também foram produzidos de forma recombinante em plantas. Como exemplo, pode-se citar as proteínas fibrosas de seda de aranha que forma expressas em tabaco, batata e *Arabidopsis thaliana*. Este material possui grande flexibilidade, elasticidade, tenacidade, sendo cinco vezes mais forte do que o aço. Estas características possibilitam diversas aplicações na indústria⁶⁷.

18.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Para uma maior eficiência de transformação e expressão de proteínas heterólogas em plantas, deve-se levar em consideração a planta na qual será produzida a proteína recombinante, a fim de se trabalhar com a que apresentar as características mais favoráveis ao objetivo final. Escolher cuidadosamente o tipo de tecido onde a expressão da proteína será induzida para que haja a maior concentração da proteína em relação à biomassa do tecido e o promotor adequado para que a expressão seja maximizada podem fazer muita diferença no resultado final do processo. Além disso, caso a produção recombinante for de um antígeno para vacinas, a adição de adjuvantes pode aumentar a eficácia da vacina⁶¹.

Observa-se uma grande quantidade de pesquisas relacionadas a aplicações tanto industriais quanto terapêuticas de proteínas produzidas em plantas transgênicas, porém poucas são as pesquisas que realmente geram produtos para o mercado consumidor. Dessa forma, são necessárias mais pesquisas e testes para que possamos incorporar cada vez mais produtos recombinantes benéficos ao nosso cotidiano, com a certeza do benefício e segurança.

REFERÊNCIAS

1. Bud R. *The Uses of Life: A History of Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 27, 301p.
2. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. 1953;171:737-8.
3. Arber W, Linn S. DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry*. 1969;38:467-500.
4. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of Biologically Functional Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1973;70:3240-4.
5. Kosaka K. Biosynthetic human insulin (BHI) by genetic recombination. *Nihon Rinsho*. 1982;8:1979-806.
6. Canhoto JM. *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2010. 407p.
7. Ju R, Tian Y, Shen Q, Liu C, Mang K: Cloning of polygalacturonase (PG) cDNA and inhibition effects of its antisense RNA on the expression of PG gene in transgenic tomato plants. *Chinese Journal of Biotechnology*. 1994;2:67-74.
8. James, C. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012*. ISAAA Brief No. 44. Ithaca: ISAAA; 2012.
9. Aragão FJ, Nogueira EO, Tinoco ML, Faria JC. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *Journal of Biotechnology*. 2013;166:42-50.
10. Brasileiro ACM, Dusi DMA. *Transformação Genética de Plantas*. In: Torres AC, Caldas LS, Buso, JA. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: ABTCP/Embrapa-CNPq;1998. p. 679-735.
11. Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH. Integrated bombardment and Agrobacterium transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2000;18:51-9.
12. Herrera-Estrella L, de Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Montagu M van, Schell J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal*. 1983;2(6):987-95.
13. Potrykus I, Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J. Direct gene transfer: state of the art and future potential. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1985;3:117-28.
14. Machado LOR, Andrade GM, Barreto CID, LP, Penchel RM, Brasileiro ACM. Agrobacterium strain specificity and shoot tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). *Plant Cell Reports*. 1997;16:299-303.
15. Lee HS, Kim SW, Lee KW, Eriksson T, Liu JR. Agrobacterium-mediated transformation of ginseng (*Panax ginseng*) and mitotic stability of the inserted beta-glucuronidase gene in regenerants from isolated protoplasts. *Plant Cell Reports*. 1995;14:545-9.

16. Lipp-Nissinen, K. Molecular and Cellular Mechanisms of Agrobacterium-mediated Plant Transformation. *Ciência e Cultura – São Paulo*. 1993;45:104-11.
17. Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. 1985;318:624-9.
18. Tzfira T, Citovsky V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology*. 2000;1:201-12.
19. Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*. 2000;23:11-28.
20. Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Reviews Phytopathology*. 1994;32:157-79.
21. Sluys MA van, Hashimoto RY, Scortecchi KC. Gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Ciência e Cultura*. 1992;44:296-300.
22. Zambryski P, Hoos H, Genetello C, Leemans J, Montagu M van, Schell J. Ti Plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal*. 1983;2:2143-50.
23. Lacorte C, Romano E. Transferência de Vetores para *Agrobacterium*. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC, editors. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-Cenargen; 1998. p. 93-110.
24. Brasileiro ACM, Dusi DMA. Transformação Genética de Plantas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso, JÁ, editors. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa; 1999.
25. Klee H, Yanofsky MF, Nester EW. Vectors for transformation of higher plants. *Biotechnology*. 1985;3:637-42.
26. Bevans MW, Flavell RB, Chilton MDA. Chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature London*. 1983;304:184-7.
27. Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperroot RAA. A binary vector strategy based on separation of vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 1983;303:179-80.
28. Brasileiro ACM. Co-cultura com Linhagens Desarmadas de *Agrobacterium*. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC, editors. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-Cenargen; 1998. p. 111-125.
29. Fleming GH, Olivares-Fuster O, Del-Bosco S, Grosser JW. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange in vitro. *Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2000;36:450-5.
30. De Cleene M, Deley J. The host range of crown gall. *Botanical Review*. 1976;42:389-466.

31. Chan MT, Chang HH, Ho SL, Tong WF, Yu SM. Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Molecular Biology*. 1993;22:491-506.
32. Frame BR, Shou HS, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg EK, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wanng K. Agrobacterium tumefaciens – Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System. *Plant Physiology*. 2002;129:13-22.
33. Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nat Biotechnol*. 1996;14:745-50.
34. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*. 1994;6:271-82.
35. Arencibia AD, Carmona ER, Téllez P, Chan MT, Yu SM, Trujillo LE, Oramas P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Transgenic Research*. 1998;7:213-22.
36. Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*. 1987;5:27-37.
37. Rech EL, Aragão FJL. Biolística. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC, editors. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen; 1998. p. 51-64.
38. Sanford JC. The biolistic process. *Trends in Biotechnology*. 1988;6:299-302.
39. Kikkert JR. The Biolistic® PDS-1000/He device. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1993;33:221-6.
40. Lacorte C, Aragão FJL, Vainstein MH, Rech EL. Biobalística. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA, editors. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH; 1999. p. 761-781.
41. Henrique-Silva F, Soares-Costa A. Production of a His-tagged Canecystatin in Transgenic Sugarcane Transgenic plants. In: Dunwell JM, Wetten AC, editors. *Trangenic Plants Methods and Protocols*. 2. ed. Totowa: Humana Press; 2012. p. 437-50.
42. Birch RG, Franks T. A gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1991;18:471-80.
43. Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes electroporated into monocot and dicot plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:5824-8.
44. Brasileiro ACM, Dusi DMA. Transformação genética de plantas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA, editors. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH; 1999. p. 679-736.

45. Tor M, Mantell SH, Ainsworth C. Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positive in *Discorea* species. *Plant Cell Reports*. 1992;11:452-6.
46. Lacorte C, Romano E. β -glucuronidase (GUS). In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. 1998;8:127-41.
47. Jefferson RA. The Gus reporter gene system. *Nature*. 1989;342:837-8.
48. Naleway JJ. In: Gallagher SR, editor. GUS Protocols: Using the GUS gene as a Reporter Expression. New York: Academic Press; 1992. 61-76.
49. Chen Y, Muller JD, Ruan Q, Gratton E. Molecular brightness characterization of EGFP in vivo by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2002;82:133-44.
50. Kain SR, Adams M, Kondepudi A, Yang TT, Ward WW, Kitts P. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques*. 1995;19:650-5.
51. Yang TT, Cheng L, Kain SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Research*. 1996;24:4592-3.
52. Van Den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, Bedbrook JRA. Chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology*. 1985, 5:299-305.
53. De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, Movva NR, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO Journal*. 1987;6(9):2513-8.
54. Comai L, Facciotti D, Hiatt WR, Thompson G, Rose RE, Stalker DM. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature*. 1985;317:741-4.
55. Ramessar K, Sabalza M, Capell T, Christou P. Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming. *Plant Science*. 2008;174:409-19.
56. Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM. The expression of a nopaline synthase – human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*. 1986;6:347-57.
57. Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJM, Hoekema A. Production of Correctly Processed Human Serum Albumin in Transgenic Plants. *Nature Biotechnology*. 1990;8:217-21.
58. Woodard SL, Mayor JM, Bailey MR, Barker DK, Love RT, Lane JR, Delaney DE, McComas-Wagner JM, Mallubhotla HD, Hood EE, Dangott LJ, Tichy SE, Howard JÁ. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale,

commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2003;38:123-30.

59. Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*. 2011;29:210-22.

60. Guana Z, Guoa B, Huoc Y, Guand Z, Weia Y. Overview of expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Vaccine*. 2010;28:7351-62.

61. Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances*. 2009;27:449-67.

62. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – a review. *Biotechnology Advances*. 2008;26:548-60.

63. Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. Engineering the Provitamin A (B-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. *Science*. 2000;287:303-5.

64. Zhao F, Shewry PR. Recent developments in modifying crops and agronomic practice to improve human health. *Food Policy*. 2011;36:S94-S101.

65. Naqvi S, Ramessar K, Farré G, Sabalza M, Miralpeix B, Twyman RM, Capell T, Zhu C, Christou P. High-value products from transgenic maize. *Biotechnology Advances*. 2011;29:40-53.

66. Xu J, Ge X, Dolan MC. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances*. 2011;29:278-99.

67. Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ. Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*. 2012;30:1171-84.

PEQUENOS RNAs E APLICAÇÕES DE RNAi EM PLANTAS

Franceli R. Kulcheski
Rogério Margis

19.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, um dos eventos mais marcantes na área das ciências biológicas foi a identificação e caracterização do papel dos pequenos ácidos ribonucleicos (do inglês *small RNAs* – sRNAs) não codificantes na regulação da expressão gênica. Essa descoberta modificou significativamente o entendimento dos mecanismos de regulação dos genes, bem como o controle de diversos processos biológicos em eucariotos.

Por muito tempo acreditou-se que o RNA não passava de uma molécula intermediária entre ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas, e que de forma alguma poderia exercer uma ampla regulação da expressão de genes, principalmente considerando pequenos fragmentos de RNA, os quais se acreditava serem apenas resíduos da degradação de longos RNAs mensageiros (mRNAs).

A descoberta do silenciamento gênico promovido por pequenas moléculas de RNA foi evidenciada em plantas nos anos 1990¹; entretanto, a compreensão do mecanismo de ação desses pequenos RNAs só ocorreu alguns anos depois, por meio de estudos com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*². Duas décadas transcorreram até os dias atuais, período marcado por um significativo avanço nas tecnologias de sequenciamento de ácidos nucleicos (*high throughput*

sequencing ou *deep sequencing*), que impulsionou a identificação e caracterização de várias classes desses pequenos RNAs³, dentre as quais: pequenos RNAs provenientes de vírus (*virus-derived short interfering RNAs* – vsiRNAs), pequenos RNAs naturais antissenso (*natural antisense short interfering RNAs* – nat-siRNAs), pequenos RNAs heterocromáticos (*heterochromatic small interfering RNAs* – hc-siRNA), microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs atuantes em *trans* (*trans-acting siRNA* – tasi-RNAs) e pequenos RNAs provenientes de fragmentos de tRNAs (*tRNA-derived RNA fragments* – tRFs).

Todos esses sRNAs agem como reguladores da transcrição gênica, podendo atuar pré, pós ou transcricionalmente. Entretanto o controle pós-transcricional é o processo biotecnológico mais amplamente utilizado para obter-se o silenciamento gênico com o uso destas moléculas. De forma geral, esses sRNAs agem sobre um mRNA. As diferentes classes de sRNAs distinguem-se pela sua origem, pela natureza dos seus genes-alvos e pela conservação evolucionária. Por exemplo, as duas principais classes de sRNAs, os pequenos RNAs de interferência (do inglês *small interfering RNAs* – siRNAs) e os miRNAs podem ser diferenciados pelo tipo de alvo sobre os quais atuam. Os siRNAs têm como alvo mRNAs derivados de transgenes, vírus, elementos transponíveis e/ou genes endógenos, enquanto os miRNAs têm como alvo mRNAs endógenos codificadores de proteínas, que geralmente pertencem a uma mesma família gênica.

O silenciamento por RNA tem sido usado como uma importante ferramenta pela genômica funcional, e tem sido também aplicado ao melhoramento genético de plantas através de duas formas. A primeira é o silenciamento de genes que afetam um incremento das características agronômicas ou que afetam o desempenho da planta durante situações de estresses. A outra forma é silenciando genes-alvos que não são endógenos das plantas, mas, sim, de outros organismos que afetam seu desenvolvimento, subsistência e produção. Nesse caso, o foco seriam os agentes causais de estresses bióticos, como insetos-praga, nematódeos, viroses e plantas daninhas.

Assim, procuramos apresentar o atual cenário dos sRNAs, bem como formas de estudá-los e as atuais e futuras aplicações do mecanismo de interferência por RNA (RNAi) em plantas. Um breve histórico sobre a descoberta de pequenos RNAs e sobre o mecanismo de silenciamento de RNA é seguido da descrição das principais classes de pequenos RNAs detectados em plantas, bem como a metodologia de análise de expressão desses RNAs via transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa (RT-qPCR). Por último, abordam-se as possíveis aplicações biotecnológicas de sRNAs no estudo da função gênica e no melhoramento de plantas.

19.2 HISTÓRICO

A descoberta do mecanismo de interferência por RNA (RNAi) foi precedida pela descoberta de pequenos RNAs antissenso expressos em plantas transgênicas⁴. Em 1990, Napoli e colaboradores¹ tentaram alterar a cor de flores de petúnia através da introdução de cópias adicionais do gene codificador da enzima chalcona sintase, uma enzima-chave para a coloração rosa ou violeta das flores de petúnia. O objetivo da superexpressão desse gene era a obtenção de flores mais escuras. Entretanto, o fenótipo observado foi o de flores menos pigmentadas, ou até mesmo completamente ou parcialmente brancas, indicando que a atividade da chalcona sintase havia sido substancialmente diminuída. De fato, ambos os genes endógenos ou transgenes apresentavam-se reprimidos nas flores brancas¹. Investigações posteriores desse fenômeno em plantas indicaram que a repressão deveu-se à inibição pós-transcricional da expressão gênica em razão de um aumento da taxa de degradação do mRNA⁵. Esse fenômeno foi então chamado de cosupressão da expressão do gene, mas o mecanismo molecular permanecia desconhecido até aquele momento.

Algum tempo após o trabalho realizado em petúnias, virologistas que pesquisavam o melhoramento de plantas quanto à resistência a doenças virais observaram um fenômeno similar ao descrito em petúnias transgênicas. Já se sabia que plantas que expressavam proteínas específicas do vírus demonstravam tolerância aumentada e até resistência à infecção viral. Entretanto, não se esperava que plantas carregando apenas sequências curtas de RNA viral não codificante também pudessem apresentar níveis similares de proteção. Alguns pesquisadores acreditavam que esse fato devia-se à capacidade do RNA viral (produzido pelos transgenes) de inibir a replicação viral⁶. O experimento reverso, no qual sequências curtas de genes de planta foram introduzidos em vírus, mostrou que o gene-alvo foi suprimido em plantas infectadas. Esse fenômeno recebeu o nome de silenciamento gênico induzido por vírus, ou, em inglês, *virus-induced gene silencing* (VIGS), e o conjunto desse tipo de fenômeno foi coletivamente chamado de silenciamento gênico pós-transcricional, ou *post-transcriptional gene silencing* (PTGS)⁷. Após essas observações iniciais em plantas, vários laboratórios em todo o mundo iniciaram uma busca por tal fenômeno em outros organismos^{8,9}.

Em 1998, Craig Mello e Andrew Fire publicaram na revista *Nature* um trabalho reportando um potente efeito de silenciamento gênico após injetar um RNA de fita dupla no nematódeo *Caenorhabditis elegans*². Investigando a produção de proteínas musculares, eles observaram que as injeções de

mRNA ou RNA antissenso não afetavam a produção de determinada proteína, mas quando era injetado um RNA de fita dupla, o silenciamento das proteínas-alvo acontecia com sucesso. Ao final desse trabalho, eles estabeleceram o termo “interferência por RNA”, ou, em inglês, *RNA interference* (RNAi). A descoberta de Fire e Mello foi particularmente notável, pois foi o primeiro trabalho a identificar o agente causal do fenômeno que resultava em silenciamento de genes, o que lhes rendeu o prêmio Nobel em fisiologia ou medicina do ano de 2006.

19.3 PEQUENOS RNAs

Nesta seção estão descritas as principais classes de pequenos RNAs detectados em plantas até o momento.

19.3.1 siRNAs

Pequenos RNAs de interferência (siRNAs) foram primeiramente descobertos em plantas, e podem ser originados tanto de componentes endógenos do transcriptoma quanto a partir de respostas a infecções virais exógenas ou de RNA dupla fita (*double-stranded RNAs* – dsRNAs) introduzidos via transgenia. Esses componentes endógenos ou exógenos podem tanto consistir em um precursor fita dupla formado a partir de uma hibridização intermolecular de duas fitas complementares de RNA quanto a partir de uma única fita de RNA que possui uma autocomplementariedade intramolecular, a qual originará uma estrutura em forma de grampo, ou *hairpin* (Figura 19.1). Os siRNAs participam de inúmeros processos, tais como: defesa contra vírus, silenciamento de transposons e transgenes, estabelecimento da heterocromatina e silenciamento pós-transcricional¹⁰.

Pequenos RNAs exógenos podem ser originados a partir da interação de plantas com vírus e a partir de transgenes inseridos em plantas. Em plantas, existem diferentes mecanismos de geração de siRNAs via PTGS: silenciamento de transgenes (S-PTGS), silenciamento induzido por vírus (VIGS) e (silenciamento induzido por sequências invertidas (IR-PTGS)).

Os dsRNAs oriundos de vírus e de transgenes são reconhecidos pela maquinaria de silenciamento da planta hospedeira¹¹. Dependendo da via de geração dos siRNAs, diferentes enzimas participarão do processo. Por exemplo, enzimas DICER-LIKE 3 (DCL3) processam siRNAs de 24 nucleotídeos

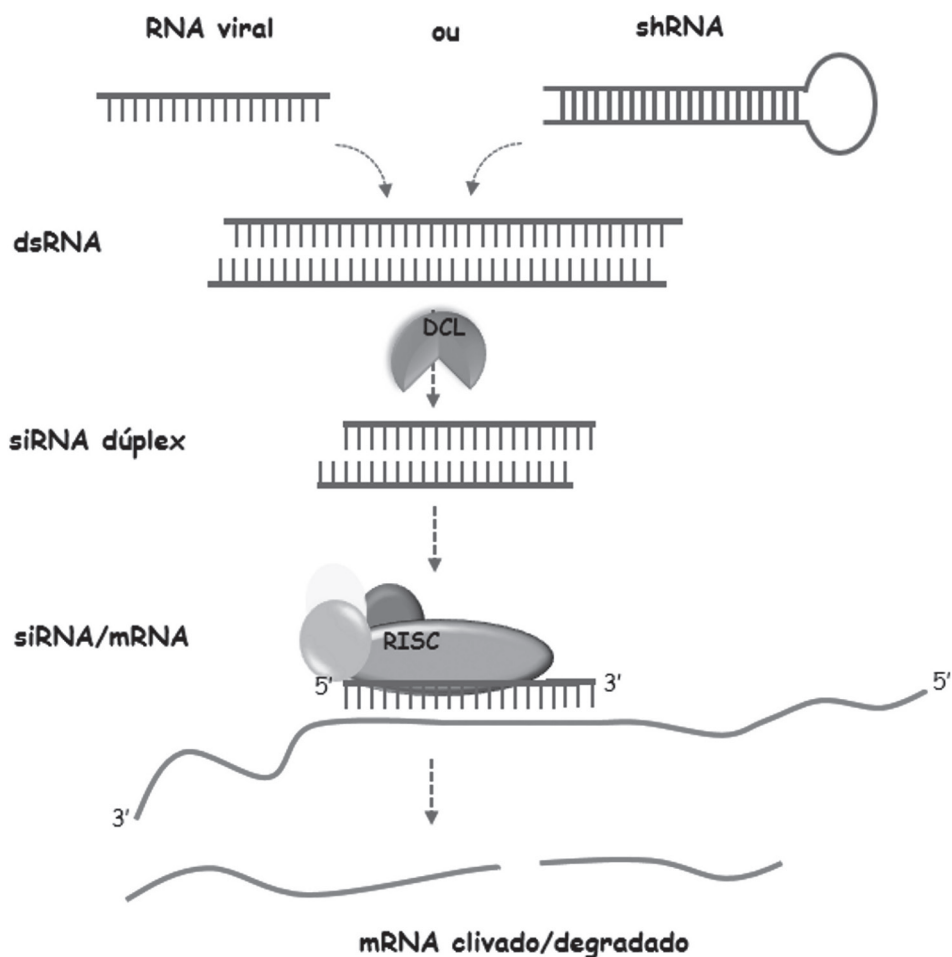


Figura 19.1 Representação esquemática da formação de siRNAs em plantas. RNAs de dupla fita (dsRNA) originados de diversas fontes, tais como: RNAs replicativos produzidos durante uma infecção viral ou transcritos artificiais expressos em organismos transgênicos que tenham a capacidade de produzir estruturas em forma de grampo (ou *hairpin* – shRNA) serão processados por enzimas DICER-LIKE (DCL) gerando siRNA dúplex. Após a separação do dúplex de siRNA, uma das fitas será transferida e acoplada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex* – RISC), no qual promoverá reconhecimento, clivagem e degradação de um mRNA-alvo.

(nt), enquanto enzimas DCL4 produzem siRNAs de 21 nt. Esses siRNAs gerados a partir do processamento de dsRNAs de origem viral são denominados vsRNAs, estando geralmente relacionados ao silenciamento viral¹¹. Em contrapartida, como parte da coevolução, os vírus possuem proteínas de inibição do mecanismo de silenciamento disparado pelo organismo

hospedeiro. Portanto, esses *exo-siRNAs* estão relacionados à defesa antiviral, pois os *siRNAs* produzidos levam ao silenciamento do vírus. Além disso, o silenciamento de transgenes ocorre pela geração de *siRNAs* a partir dos *dsRNAs* transcritos dos transgenes inseridos de forma estável e/ou transiente no genoma hospedeiro.

Na via de produção de *siRNAs* endógenos, podem ser destacados dois grupos: os *siRNA* heterocromáticos (*hc-siRNAs*) e os transcritos de *siRNA* natural antissenso (*nat-siRNAs*). Outras subdivisões podem ser encontradas em outros trabalhos; entretanto, neste capítulo escolhemos abordar as classes mais amplamente detectadas.

Os *hc-siRNAs* são transcritos a partir de regiões repetitivas do genoma (tais como transposons, retroelementos e DNA ribossomal) por uma RNA polimerase IV (ou ainda por uma RNA pol V). Esses transcritos são processados em fragmentos de 24 nt originados pela atividade de uma DCL3¹²⁻¹⁴. Os *hc-siRNAs* são responsáveis pelo silenciamento transcricional por uma via conhecida como metilação do DNA dependente de RNA (*RNA-dependent DNA methylation* – RdDM)¹⁵.

Os *hc-siRNAs* promovem a metilação do DNA de regiões homólogas à sua sequência em um processo que requer a ação de uma enzima Argonauta (AGO4) e da RNA pol V presentes em um mesmo complexo proteico¹⁶. O complexo de silenciamento induzido por RNA (ou *RNA-induced silencing complex* – RISC) contendo *hc-siRNA*, AGO4 e RNA pol V recruta uma metiltransferase (*domains rearranged methyltransferase 2* – DRM2) e uma metiltransferase defectiva em metilação de DNA direcionada por RNA (*defective in RNA-directed DNA methylation* – DRD1), as quais promovem a metilação do DNA e das histonas, proporcionando, assim, um silenciamento transcricional *lócus-específico*¹⁶. Foi demonstrado que AGO6 também pode estar envolvida na rota dos *hc-siRNAs*, possuindo características análogas às de AGO4¹⁷.

Outro grupo de *siRNAs* são os pequenos RNAs naturais antissenso (*nat-siRNAs*), os quais são originados de *dsRNAs* formados por homologia entre dois transcritos que podem ser RNAs não codificantes (*non coding RNAs* – ncRNAs) ou mRNAs¹⁸. Esses transcritos antissenso naturais podem ser originados do mesmo *lócus* quando este é transcrito em ambos os sentidos (*cis-NAT*) ou de *lócus* diferentes (*trans-NAT*)¹⁸. Até o momento, observou-se na maioria dos trabalhos que um dos NATs é transcrito constitutivamente, e a indução do outro NAT é que promove a formação do *dsRNA* precursor. Foi observado que em *Arabidopsis thaliana* essa indução ocorre sob estresse salino ou infecção bacteriana^{19,20}.

O transcrito induzido por estresse é sintetizado por uma RNA pol IV e não codifica proteínas¹⁹. A região complementar aos dois transcritos é então reconhecida pela DCL2, a qual cliva o dsRNA formando os nat-siRNAs primários que consistem em sequências de 24 nt metilados por uma enzima *Hua Enhancer 1* (HEN1)¹⁹. Os nat-siRNAs são acoplados ao complexo RISC, onde ocorrerá a clivagem dos mRNAs-alvos²¹. O alvo do nat-siRNA primário é o próprio transcrito NAT, o qual é expresso constitutivamente. Após a clivagem de NAT, uma RNA dependente de RNA polimerase (*RNA-dependent RNA polymerase* – RDR6) produz dsRNAs que são reconhecidos por DCL1, que, por sua vez, produz os nat-siRNAs secundários de 21 nt, os quais também terão como alvo os próprios NATs constitutivos^{19,20}.

19.3.2 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) podem ser considerados como a principal classe de pequenos RNAs reguladores envolvidos na regulação da expressão gênica, atuando em uma série de processos biológicos, como crescimento, desenvolvimento e adaptação a diversos estresses. O primeiro miRNA descrito, *lineage-deficient-4* (*lin-4*), foi descoberto em 1993 e identificado como regulador pós-transcricional do gene *lin-14*, que está envolvido no controle do desenvolvimento larval de *C. elegans*²². Em plantas, a identificação de miRNAs e da enzima envolvida em sua biogênese ocorreu em *Arabidopsis* pela primeira vez, em 2002, por dois grupos distintos^{23,24}. Atualmente, miRNAs têm sido identificados em inúmeras espécies, e todas as sequências de seus precursores e formas maduras estão disponíveis em um banco de dados público denominado miRBase^{*25-29}. O aumento na identificação de miRNAs tem demonstrado a relação destes com diversos processos celulares. Inúmeros miRNAs identificados em plantas foram associados com o desenvolvimento³⁰⁻³², sinalização hormonal³³, floração e determinação sexual³⁴, bem como com respostas a estresses bióticos e abióticos^{30,35-39}.

Análises experimentais e computacionais têm demonstrado que muitos miRNAs, bem como seus alvos, são conservados entre espécies de monocotiledôneas (arroz) e dicotiledôneas (*Arabidopsis*)⁴⁰⁻⁴². Esses estudos têm evidenciado que a origem dos miRNAs ocorreu em uma fase inicial da evolução dos eucariotos, antecedendo à divergência entre plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

* Ver <http://www.mirbase.org>.

Em plantas, os genes de miRNAs são transcritos por uma RNA polimerase do tipo II (RNA pol II)^{43,44}; embora alguns miRNAs possam também ser transcritos pela RNA pol III⁴⁵. Os transcritos iniciais de miRNAs são chamados miRNAs primários (pri-miRNAs). A RNA pol II gera pri-miRNAs capeados e poliadenilados tanto em plantas quanto em animais⁴⁴. Após a transcrição dos pri-miRNAs, a proteína DAWDLE (DDL) liga-se a eles, protegendo-os da degradação. Este pri-miRNA forma uma estrutura em formato de grampo (*hairpin structure*) imperfeita, a qual será processada em um precursor do miRNA (pré-miRNA) também conhecido como estrutura *stem-loop*. Em plantas, tanto pri quanto pré-miRNAs são processados no núcleo por uma enzima do tipo RNase III denominada DCL1⁴⁶. O processamento do pri-miRNA em pré-miRNA ocorre em um centro de processamento nuclear conhecido como corpo-D (do inglês *D-body*, ou SmD3/SmB-*body*). Embora não esteja clara a questão do comprimento dos pri-miRNAs, sabe-se que todos podem dobrar e originar uma estrutura secundária em formato de grampo⁴⁷. Possuir estruturas *hairpin* é uma importante característica de miRNAs⁴⁸. Pré-miRNAs, ainda no núcleo, são clivados pela DCL1 e pela proteína HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), originando um dúplex miRNA:miRNA*^{46,49,50}. Os dúplex miRNA:miRNA* recentemente processados possuem dois nucleotídeos sobressalentes na região terminal 3' de cada fita e são facilmente degradados por uma classe de exonucleases conhecidas como *small RNA degrading nuclease* (SDN)⁵¹. Para estabilizar o dúplex miRNA:miRNA*, uma metiltransferase de pequenos RNAs, HEN1, imediatamente metila os nucleotídeos no terminal 3' de cada fita, prevenindo, assim, sua uridilação e subsequente degradação⁵². Em mutantes *hen1*, observou-se falta ou acúmulo mínimo de miRNAs, sugerindo o papel de HEN1 na proteção de miRNAs contra a degradação⁵³. O dúplex miRNA/miRNA* é então transportado do núcleo para o citoplasma pela proteína de membrana HASTY⁵⁴ (Figura 19.2).

No citoplasma, o dúplex miRNA:miRNA* é separado e a fita de miRNA é incorporada ao complexo RISC, formando, assim, o complexo miR-RISC⁵⁵, no qual uma proteína AGO1 cliva o mRNA-alvo no meio do dúplex mRNA:miRNA (Figura 19.2). Já a fita miRNA* será degradada. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que miRNA* também pode funcionar como uma sequência de miRNA regular e controlar a expressão de genes-alvos específicos⁵⁶.

A sequência de um miRNA maduro pode variar entre 19 a 24 nt e atua silenciando genes pós-transcricionalmente, através do pareamento com a sequência do mRNA-alvo, levando à clivagem ou à repressão traducional

deste^{57,58}. Além disso, um mesmo miRNA maduro pode apresentar sequências que variam de um a dois nucleotídeos no seu comprimento. Essas populações de miRNAs são chamadas de isomiRNAs, o que significa isoforma de um miRNA. A origem dessas variantes de miRNAs ainda não está elucidada. Alguns autores acreditam que elas ocorram devido a um erro de clivagem da DCL1 durante o processamento do pré-miRNA^{56,59}; entretanto, existem opiniões divergentes quanto a essa teoria. Como descrito anteriormente, os processos de biogênese e ação de miRNAs requerem a combinação e interações físicas de várias enzimas e/ou proteínas, como as proteínas DCL1, SE (proteína SERRATE, a qual contém motivos C2H2-*zinc finger*), CBC (*cap-binding complex*), AGO, RDPs, RNA *helicase* SDE3, HYL1 e CPL1 (*C-terminal domain phosphatase-like 1*)^{46,60-64}.

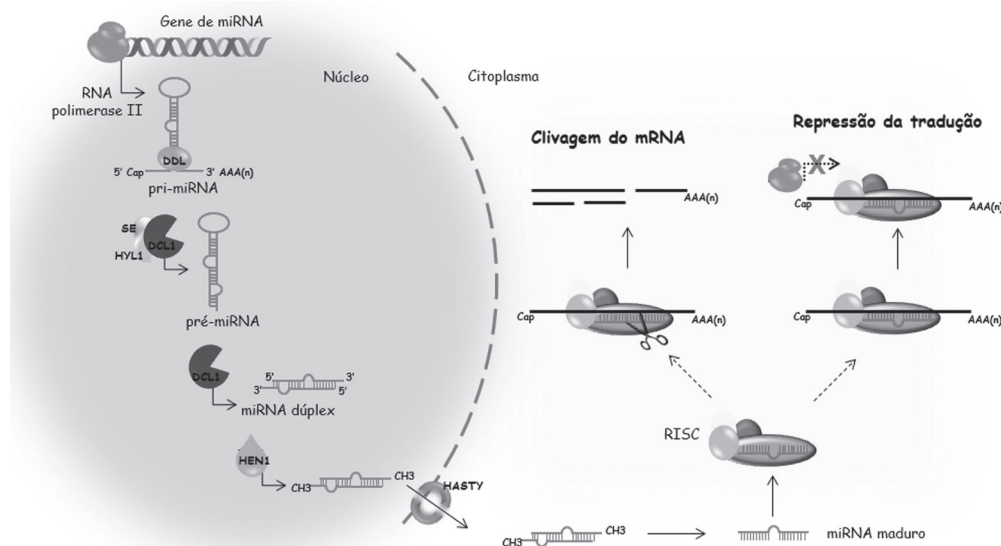


Figura 19.2 Biogênese e modos de ação dos miRNAs em plantas. Os pri-miRNAs são transcritos por uma RNA pol II formando uma estrutura em formato de grampo poliadenilada em sua extremidade 3'. A essa estrutura liga-se a proteína DAWDLE (DDL), responsável por estabilizar o pri-miRNA até sua conversão em pré-miRNA. Esse processo conta com a ação combinada das proteínas SERRATE (SE), HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1) e DICER-LIKE 1 (DCL1). O pré-miRNA é então clivado novamente por uma DCL1, gerando um dúplice miRNA:miRNA* com extremidades 3' salientes, que será exportado para o citoplasma pela proteína de membrana HASTY. Ambas as sequências miRNA:miRNA* serão metiladas por uma metilase HEN1, protegendo as sequências da degradação via nucleases degradadoras de smRNAs (SDN). A fita guia de miRNA é então incorporada em proteínas AGO componentes do complexo RISC, formando o complexo miR-RISC e agindo no silenciamento gênico.

A perda de função de DCL1 e SE é geralmente letal e causa a morte da planta ainda nos primeiros estágios embrionários, uma vez que nenhum

acúmulo de miRNA maduro é observado nas células vegetais⁶⁵. Mutantes *ddl* e *cbc* também têm baixo acúmulo de miRNAs⁶⁶. Entretanto, outras evidências sugerem que a proteína DDL pode ter outras funções além de participar da biogênese de miRNAs, uma vez que mutantes *ddl* possuem anormalidades mais fortes no desenvolvimento da planta que *dcl1* mutantes⁶⁷.

Outro estudo demonstrou que a perda de função do gene *HASTY* resultou apenas em um decréscimo de miRNAs no citoplasma, o que sugere que miRNAs podem também ser transportados por outros mecanismos⁶⁸. Uma mutação do gene *HYL1*, responsável pela proteína que atua em conjunto com DCL1 na primeira fase de processamento do pri-miRNA, também levou à alteração do desenvolvimento foliar, além de afetar a dominância apical e a sensibilidade hormonal em *Arabidopsis*. Essas plantas apresentaram alta sensibilidade ao ácido abscísico e baixa sensibilidade à citocina e à auxina^{69,70}.

19.3.3 tasiRNAs

Em plantas, existem genes *TAS*, os quais são transcritos por uma RNA polimerase II em longos RNAs denominados tasiRNAs primários^{71,72}. Esses transcritos são reconhecidos e clivados por miRNAs associados a proteínas AGO1 ou AGO7 (dependendo do miRNA). Entretanto, em vez de serem silenciados, esses transcritos de RNA não codificante clivados são usados como molde para a síntese de RNAs fita dupla (dsRNA) através da ação de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp-RDR6), com o auxílio de uma proteína supressora de silenciamento gênico (*suppressor of gene silencing 3* – SGS3). Os dsRNAs são reconhecidos e clivados por enzimas DCL4 e processados em pequenos RNAs de 21 nt, os quais serão denominados tasiRNAs. Os tasiRNAs vão associar-se ao complexo RISC e silenciar seus alvos (Figura 19.3).

Existem quatro famílias de tasiRNAs. As famílias recebem seus nomes conforme a localização dos genes *TAS* a partir dos quais estes foram transcritos. As famílias *TAS1*, *TAS2* e *TAS4* codificam mRNAs com um sítio de clivagem, enquanto *TAS3* possui dois sítios. Os transcritos *TAS1* e *TAS2* são alvos do microRNA miR173, e *TAS4* do microRNA miR828, e todos são clivados por AGO1. Já *TAS3* é reconhecido pelo miR390 em dois sítios distintos, sendo que a clivagem é mediada por AGO7.

A ação regulatória mais proeminente dos tasiRNAs é o controle de fatores transcricionais responsivos à auxina (*auxin response factors* – ARFs),

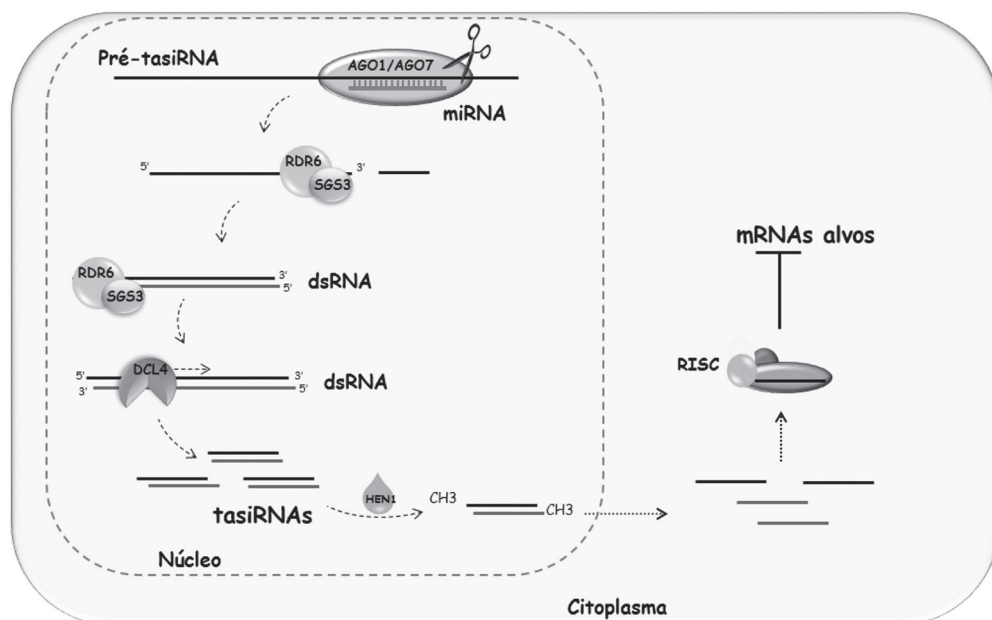


Figura 19.3 Geração de trans-acting siRNAs (tasiRNAs). Transcritos gerados a partir de loci TAS são reconhecidos e clivados por miRNAs associadas a proteínas argonauta (AGO1 ou AGO7). Os fragmentos originados são estabilizados pelas proteínas SGS3 e utilizados como molde por uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp-RDR6) para a síntese de RNAs de fita dupla (dsRNA). Esses dsRNA serão reconhecidos e clivados por uma DCL4, originando tasiRNAs que podem associar-se ao complexo RISC, levando à regulação de seus alvos.

que participam da via de sinalização do hormônio auxina, o qual desempenha um papel central no desenvolvimento das plantas.

19.3.4 tRFs

Os RNAs transportadores ou tRNAs são uma classe de RNA não codificante, ubíquos e necessários para a leitura do código genético e subsequente síntese proteica. Os tRNAs são transcritos por RNAs polimerase III em pré-tRNAs, os quais são processados por uma RNase P, a qual cliva uma sequência 5' *leader*, e por uma RNase Z, a qual retira uma sequência 3' *trailer*. Após esse processamento, ocorrem modificações de bases, tais como adição de pseudouridina e adição de um trinucleotídeo CCA à extremidade 3', a qual é posteriormente utilizada para acoplamento do aminoácido, resultando no tRNA ativado ou maduro.

Recentemente, uma nova classe de pequenos RNAs foi identificada a partir de culturas celulares humanas, e foi denominada de fragmentos derivados de RNA transportador (*transfer RNA-derived fragments* – tRFs)⁷³, os quais possuem tamanho entre 18 a 22 nucleotídeos. Um tRNA pode originar três tipos de tRFs, os quais são nominados conforme a posição de origem no RNA transportador, podendo ser tRFs-1 originado pela liberação da extremidade 3' do pré-tRNA pela tRNAse Z; tRFs-5', originados da extremidade 5' do tRNA; e tRFs-3', produzidos a partir da extremidade 3' do tRNA maduro, isto é, após a adição do trinucleotídeo CCA (Figura 19.4).

Trabalhos recentes demonstraram a existência de tRFS em plantas. Por exemplo, em *Arabidopsis*, foram identificados tRFs provenientes da porção 5' do tRNA AspGTC e tRFS das porções 5' e 3' CCA do tRNA GlyTCC, sendo superexpressos em tecidos e raízes submetidos à privação de fosfato⁷⁴. Em arroz, tRFs provenientes do terminal 5' do tRNA-AlaAGC e -ProCGG demonstraram ser diferencialmente expressos em tecidos foliares e calos³. Já em cevada, tRF proveniente de tRNA-HisGTG foi o mais abundante de todos os tipos de sRNAs⁷⁵. Embora o modo de ação do tRFS ainda não esteja bem esclarecido, um recente trabalho realizado em *Arabidopsis* demonstrou que esses sRNAs ligam a enzima AGO, indicando que talvez possam regular seus alvos via complexo RISC⁷⁶.

19.4 METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE sRNAs: RT-qPCR

A transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) literalmente revolucionou o estudo da expressão gênica. Na reação de RT-qPCR, o RNA molde é duplicado com a geração de uma fita de DNA complementar (cDNA) através da enzima transcriptase reversa. A sequência de cDNA de interesse é então amplificada exponencialmente usando qPCR, também chamada de PCR em tempo real.

O desenvolvimento de químicas modernas e plataformas de instrumentação que possibilitam a descoberta de produtos da PCR em tempo real conduziu à adoção difundida dessa técnica como o método de escolha para quantificar a mudança na expressão dos genes durante os últimos anos. Além disso, a PCR em tempo real tornou-se o método preferido para validar resultados obtidos por meio de análises que avaliam a expressão de gene em larga escala, como, por exemplo, sequenciamentos de última geração⁷⁷. Dessa forma, qPCR também foi eleita como uma das metodologias

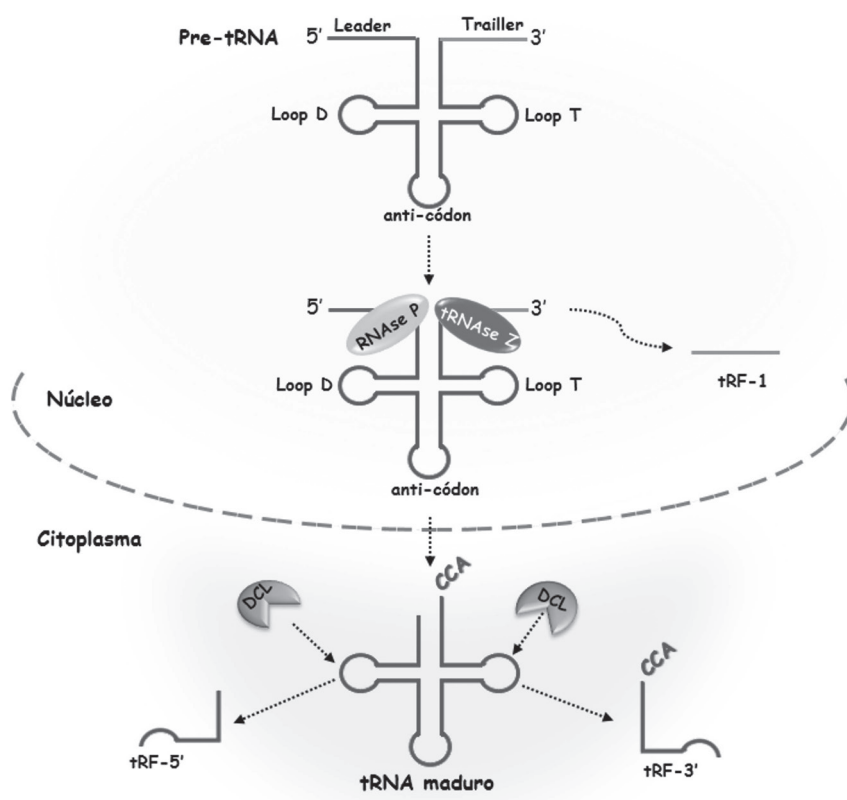


Figura 19.4 Biogênese de pequenos RNAs derivados de RNAs transportadores (tRFs). O RNA transportador (tRNA) é transcrito por uma RNA polimerase do tipo III em um precursor (pré-tRNA) contendo uma sequência leader no terminal 5' e uma trailer na extremidade 3'. Ambas as sequências são removidas por ação de uma RNase P e Z respectivamente. A sequência trailer, liberada pela RNase Z, consiste em um tRF do tipo I (tRF-1). Após esse processamento ocorre a adição de uma sequência CCA na extremidade 3', finalizando a maturação do tRNA. O tRNA maduro é então exportado para o citoplasma, onde poderá sofrer clivagens por enzimas do tipo DICER na porção do Loop T, liberando o tRF-3', ou no Loop D, originando tRF-5'. Os tRFs podem variar de 18 a 22 nt de comprimento.

preferidas para identificar diferenças globais na expressão de pequenos RNAs entre diferentes amostras.

Inicialmente o método de RT-qPCR foi aplicado para análises de miRNAs, e, dessa forma, algumas alterações na etapa de síntese do cDNA foram efetuadas para superar o desafio que era transcrever uma fita complementar relativa a pequenas sequências de RNA, que além de estarem presentes como sequências maduras, ainda poderiam ser detectadas nos transcritos primários e precursores destas. Neste cenário, foram desenvolvidas duas

metodologias para síntese do cDNA de miRNAs, as quais passaram a ser também utilizadas nas análises de expressão de outras classes de pequenos RNAs. Como os trabalhos foram inicialmente realizados com miRNAs, a seção a seguir refere-se a miRNAs, mas salienta-se que tais trabalhos podem ser aplicados a outros sRNAs.

19.4.1 Síntese de cDNA

O primeiro passo na qPCR de miRNAs é uma conversão acurada e completa do RNA em um DNA complementar (cDNA) através da transcrição reversa. Entretanto, este passo não é tão simples, devido: (1) ao tamanho limitado da fita molde (aproximadamente 22 nt), (2) à inexistência de uma sequência comum para utilizar no enriquecimento e amplificação dos miRNAs; e (3) ao fato de a sequência madura do miRNA estar presente nos pri e pré-miRNAs.

Até o momento, duas diferentes abordagens para sintetizar o transcrito reverso de miRNAs têm sido utilizadas. Na primeira abordagem, miRNAs são transcritos reversamente através de oligonucleotídeos específicos para cada miRNA, método também conhecido por *stem-loop*⁵⁵. Na segunda metodologia, uma cauda contendo uma sequência comum é adicionada a todos os miRNAs, e estes são transcritos reversamente através de um oligo reverso comum⁷⁸. A seguir, ambas as metodologias serão discutidas.

19.4.1.1 Método *stem-loop*

Nesta metodologia, a amplificação de cada miRNA é realizada utilizando três oligonucleotídeos:

- um oligonucleotídeo *stem-loop*, o qual consiste em 44 nucleotídeos fixos que formam uma haste (dois braços pareados) e um *loop* (5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATAC-GACNNNNNN 3') e seis nucleotídeos adicionais complementares à região 3' da porção terminal do miRNA maduro;
- um oligonucleotídeo direto específico, o qual é idêntico à sequência completa do miRNA maduro e que será utilizado na reação de qPCR;

- um oligonucleotídeo universal reverso, uma sequência conservada (5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3') e que será empregada nas reações de qPCR de distintos miRNAs. O oligo universal reverso hibridizará na região correspondente ao *loop* do transcrito reverso.

A complexidade dos oligonucleotídeos *stem-loop* aumenta a especificidade da reação, uma vez que ocorre uma diminuição do anelamento do oligo às sequências de pri e pré-miRNAs. Já os oligonucleotídeos lineares não apresentam essa especificidade e podem anelar tanto nos miRNAs maduros quanto em seus precursores; consequentemente, os passos de anelamento e a transcrição reversa devem ser otimizados para prevenir a interação entre esses oligos e os pri e pré-miRNAs. Uma representação esquemática dos passos envolvidos na síntese de cDNA pelo método *stem-loop* pode ser observada na Figura 19.5A.

19.4.1.2 Método *poliA*

Uma abordagem alternativa é a extensão da porção terminal 3' do miRNA através da adição de uma sequência polimérica única e comum. Nesse caso, são adicionados nucleotídeos de adenina ou timina via ação da terminal nucleotidil transferase de *Escherichia coli*⁷⁸. Um oligonucleotídeo consistindo em uma sequência oligo-dT, contendo por sua vez uma sequência à qual se ligará um oligo universal na sua posição 5' é, então, utilizado para a transcrição reversa e para amplificar as sequências-alvos durante a qPCR.

A porção de dTs entre o miRNA e a sequência universal do oligo dT é definida utilizando sequências degeneradas no terminal 5' do oligonucleotídeo, o qual ancora o oligo ao terminal 3' do miRNA.

19.4.2 Detecção dos produtos da qPCR

O princípio da qPCR está baseado na detecção, em tempo real, de uma molécula fluorescente repórter cuja intensidade do sinal emitido é correlacionada à quantidade de DNA presente em cada ciclo de amplificação^{79,80}. Existe uma gama de fluoróforos utilizados em reações de qPCR; entretanto, nas que envolvem amplificação de miRNAs, os mais amplamente utilizados são SYBR Green I e sondas TaqMan. Estão disponíveis no mercado dois tipos de SYBR Green, SYBR Green I e II. Enquanto SYBR Green I liga-se

preferencialmente ao DNA dupla fita (do inglês *double stranded DNA* – dsDNA), SYBR Green II se liga ao RNA. Neste capítulo, SYBR Green se refere a SYBR Green I.

19.4.2.1 Detecção de produtos da qPCR utilizando SYBR Green

O SYBR Green é uma molécula intercalante cuja fluorescência aumenta aproximadamente cem vezes apenas sob associação com dsDNA, e essa propriedade é utilizada para detectar os produtos de amplificação acumulados durante os ciclos da PCR. É importante salientar que o SYBR Green não consegue discriminar entre diferentes produtos da PCR e liga-se a todos os dsDNAs, incluindo dímeros de oligonucleotídeos⁸¹. Essa característica limita uma detecção acurada da sequência-alvo e requer metodologias que acessem a especificidade dos produtos gerados pela amplificação. Entretanto, o uso de SYBR Green permite realizar uma análise do ponto de *melting*, também chamada de análise de curva de dissociação, um importante passo para monitorar a homogeneidade dos produtos de qPCR⁷⁹.

Durante a curva de *melting*, a intensidade da fluorescência do SYBR Green que está intercalado nos produtos da PCR é anotada durante um período em que a temperatura de início é de 65 °C e sofre pequenos aumentos até atingir 95 °C. Esse aumento gradual da temperatura desnatura o dsDNA, o que ocasiona uma consequente redução do sinal de fluorescência, a qual será detectada por um queda acentuada na intensidade do sinal quando ambas as fitas de DNA estiverem completamente separadas. Como a temperatura de *melting* (T_m) de um DNA fita dupla é dependente do comprimento e composição nucleotídica da sequência, o número de inflexões na curva de *melting* indica o número de produtos da PCR (incluindo dímeros de oligonucleotídeos) gerados. Uma curva de dissociação aceitável apresenta um pico único, isto é, um único produto da PCR, enquanto a ocorrência de picos múltiplos indica a presença de produtos de amplificação não específicos⁷⁹.

O emprego de SYBR Green durante RT-qPCR tem sido comprovado como um eficiente método para a detecção de produtos de expressão de miRNAs por alguns autores^{78,82}. Por exemplo, na Figura 19.5B, estão demonstrados os gráficos de amplificação e as curvas de *melting* de dois miRNAs de soja relacionados: miR166a (5' TCGGACCAGGCTTCATTCCCC 3') e miR166de (5' TCGGACCAGGCTTCATTCCCG 3'). Esses miRNAs se diferenciam por apenas um nucleotídeo na extremidade 3', e mesmo com essa

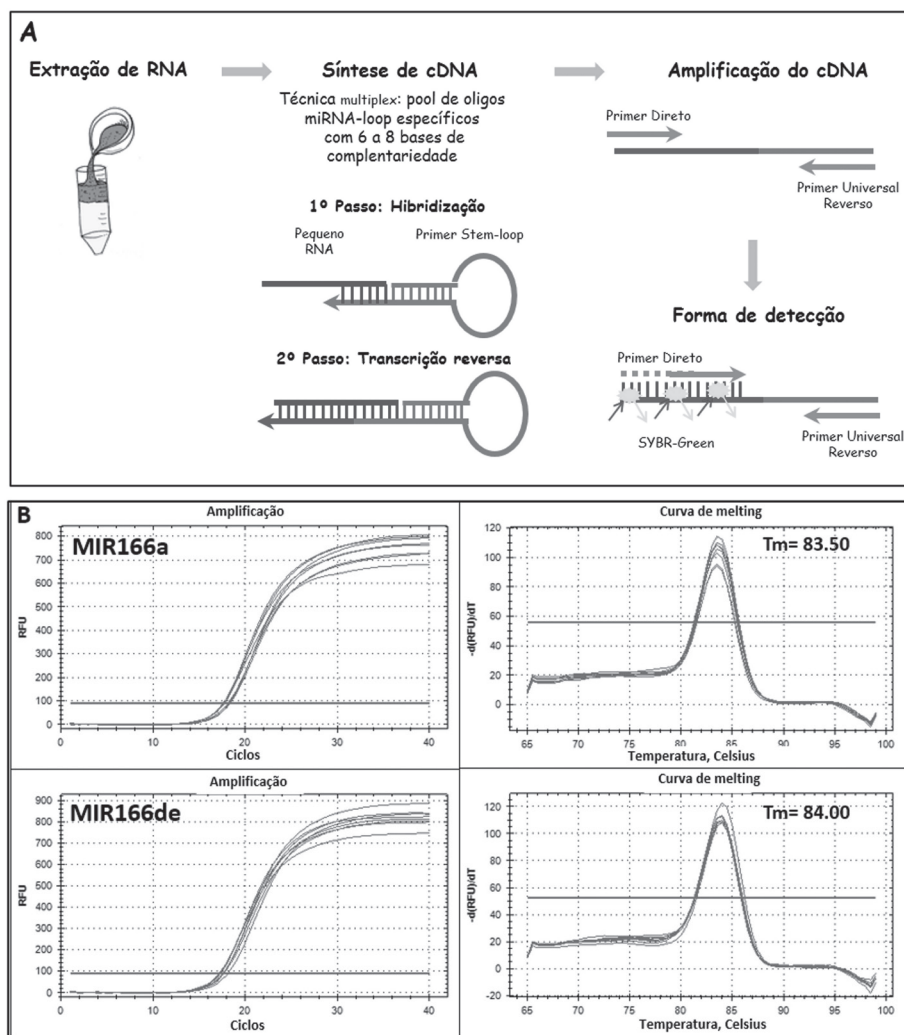


Figura 19.5 Metodologia de quantificação de pequenos RNAs através da RT-qPCR. (A) Representação esquemática da RT-qPCR utilizando oligonucleotídeos *stem-loop* e o fluoróforo SYBR Green: após a extração do RNA total é realizada a síntese da fita complementar (cDNA) por transcrição reversa. Nessa fase é preparado um *pool* com vários oligos *stem-loop*, possibilitando a síntese de cDNAs para vários sRNAs distintos em uma única reação. Os oligos *stem-loop* se ligam a região 3' terminal da sequência de pequeno RNA maduro, o qual será transcrito reversamente por uma transcriptase reversa. Então, os transcritos reversos serão quantificados utilizando um fluoróforo SYBR Green, o qual possui a capacidade de intercalar DNA de fita dupla. Para a amplificação dos transcritos reversos são utilizados oligos diretos (idênticos à sequência madura do pequeno RNA) e o oligo universal reverso (correspondente a uma região conservada entre todos os oligos *stem-loop*). (B) Exemplos de gráficos da qPCR em tempo real para dois miRNAs de soja, miR166a e miR166de, utilizando o método *stem-loop* e o fluoróforo SYBR Green. São observadas as completas amplificações, bem como as distintas curvas de *melting* para ambos os miRNAs, os quais possuem sequências quase idênticas, comprovando a capacidade de alta especificidade dessa metodologia.

ampla similaridade, durante a curva de dissociação foram observados dois picos únicos distintos entre esses miRNAs testados, demonstrando a alta especificidade da amplificação.

19.4.2.2 Detecção de produtos da qPCR utilizando TaqMan

Outra possibilidade de detecção dos produtos amplificados durante a qPCR é o emprego das sonda TaqMan. Essas sondas são marcadas em cada extremidade por um fluoróforo repórter (molécula que emite luz) e um *quencher* (molécula capaz de captar a energia do fluoróforo em forma de luz e dissipá-la tanto na forma de luz quanto de calor). A proximidade do fluoróforo repórter com a sua molécula *quencher* previne a emissão de fluorescência. Entretanto, durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan hibridiza com a fita simples de cDNA. No processo de amplificação a sonda TaqMan é degradada devido à atividade de exonuclease 5' → 3' da enzima Taq DNA polimerase, separando o *quencher* do fluoróforo durante a extensão, o que resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Dessa forma, durante o processo de qPCR a emissão da fluorescência é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e é degradada simultaneamente à amplificação da sequência-alvo estabelecida. Cabe salientar que embora os dímeros de oligonucleotídeos, bem como produtos inespecíficos gerados durante a amplificação, não emitam qualquer sinal de fluorescência, esses produtos irão afetar negativamente tanto a eficiência quanto a sensibilidade da reação de qPCR.

19.4.3 Passo a passo: protocolo da RT-qPCR por *stem-loop*

Passo 1: síntese de cDNA

Os oligonucleotídeos *stem-loop* de todos os miRNAs a serem testados são agrupados em uma mesma reação, para a síntese de cDNA *multiplex*, que ocorre em duas etapas:

- I) Hibridização dos oligonucleotídeos *stem-loop* com o RNA total, conforme a reação a seguir:

| | |
|---|------------|
| RNA total | 0,1 a 2 µg |
| Mix de oligonucleotídeos <i>stem-loop</i> (0,5 µM cada) | 1 µL |
| H ₂ O | q.s.p |
| Volume total | 10 µL |

- Incubar a 70 °C por 5 minutos.
- Imediatamente transferir para banho de gelo.

II) Síntese da primeira fita de cDNA com a enzima transcriptase reversa RNase H de M-MLV, conforme reação a seguir:

| | |
|----------------------------|-------|
| Material da etapa I | 10 µL |
| Tampão 5X M-MLV RT | 6 µL |
| dNTP (5mM) | 2 µL |
| Enzima M-MLV RT (200U/ µL) | 1 µL |
| H ₂ O | 11 µL |
| Volume total | 30 µL |

- Incubar a reação a 40 °C por 60 minutos.
- Ao final, diluir a reação na proporção 1:10 com H₂O (solução de estoque).
- Para solução trabalho, utilizar uma diluição 1:30 a 1:50.
- O cDNA deve ser armazenado a –20 °C.

Passo 2: qPCR

Neste protocolo o fluoróforo de escolha para detectar o produto de amplificação será o SYBR Green I.

Para a amplificação em tubos de 200 µL ou mesmo em placas de 96 poços (dependendo da escolha pessoal), as reações podem ser realizadas em um volume total de 20 µL.

Todos os reagentes empregados com as respectivas concentrações finais para cada reação estão descritos a seguir:

| CDNA (DILUÍDO 1:30) | 10 µL |
|------------------------------------|--------|
| MIX | 10 µL |
| Tampão Taq DNA polimerase | 1 X |
| MgCl ₂ | 3 mM |
| dNTP | 25 µM |
| Oligonucleotídeo direto | 0,2 µM |
| Oligonucleotídeo universal reverso | 0,2 µM |
| SYBR Green I | 0,1 X |
| Enzima Taq DNA polimerase | 0,25 U |

As condições de amplificação são:

- I) Ativação inicial da enzima Taq DNA polimerase por 5 minutos a 95 °C.
- II) Desnaturação a 95 °C por 15 segundos.
- III) Hibridização a 60 °C por 10 segundos.
- IV) Elongação a 72 °C por 10 segundos.
- V) Repetição dos passos II a IV por 40 ciclos.

A análise de curva de *melting* ou curva de dissociação deve ser realizada no final da PCR e programada para um aumento da temperatura de 65 °C a 99 °C.

Embora a parte de análise de expressão de miRNAs não seja abordada neste capítulo, salienta-se que o método mais amplamente utilizado na análise de miRNAs é a quantificação relativa⁸³ ou $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

19.5 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DOS PEQUENOS RNAs

19.5.1 Pequenos RNAs de interferência (siRNAs)

Os pequenos RNAs de interferência (siRNAs) podem ser utilizados para estudos da função gênica ou obtenção de organismos com características especiais com base no silenciamento de genes de interesse. A estratégia básica utilizada é a geração de organismos geneticamente modificados que

contêm transgenes na posição senso e antissenso. Esses transgenes são capazes de gerar RNAs dupla fita (dsRNAs) os quais serão clivados por enzimas DCL, gerando pequenos fragmentos de RNA fita simples, os chamados de siRNAs. A sequência antissenso de siRNA é acoplada ao complexo RISC e identificará o mRNA-alvo, levando a um silenciamento desse transcrito.

O uso de siRNAs pode ser uma ferramenta bastante eficaz para a investigação da função de genes uma vez que dsRNAs podem ser introduzidos nas células para induzir o silenciamento seletivo de genes específicos de interesse. Por outro lado, a RNAi também é considerada uma alternativa promissora para a manipulação de plantas com baixos níveis de toxinas, redução dos níveis de alérgenos, bem como resistência a patógenos e pragas (Figura 19.6) que acometem inúmeras plantas de interesse econômico.

Um exemplo que se tornou bastante famoso na aplicação de RNAi para o controle de pragas foi o milho desenvolvido pela empresa Monsanto para controle da lagarta-da-raiz (*Diabrotica virgifera* LeConte)⁸⁴. A companhia

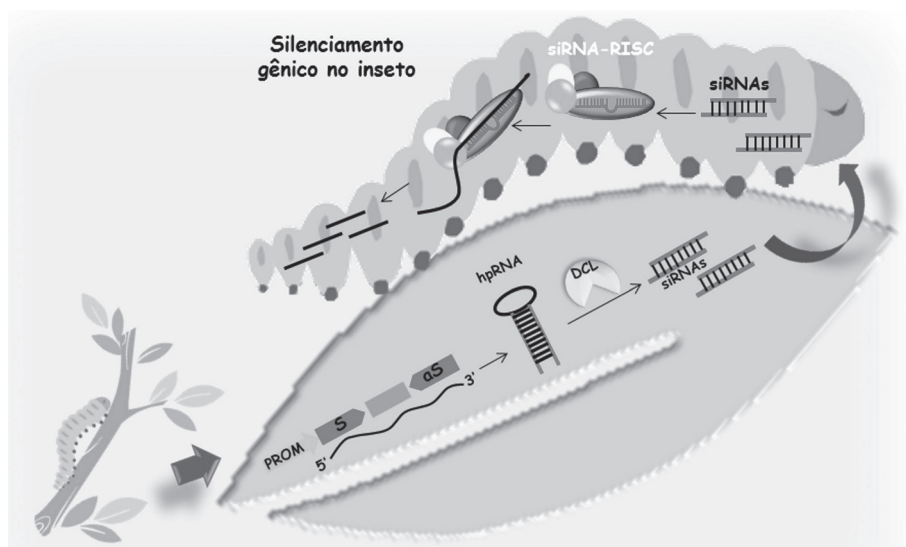


Figura 19.6 Exemplo de aplicação biotecnológica utilizando pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Produção de uma planta transgênica contendo uma construção com sequências senso (S) e antissenso (AS) sob o controle de um promotor (PROM), as quais possuem homologia com uma sequência específica de algum gene de interesse do organismo-alvo, neste caso um inseto-praga. O transcrito do transgene inserido na planta se organizará em estruturas na forma de um grampo (hpRNA) que serão processadas pela maquinaria de biogênese de siRNAs da planta (DCL), produzindo siRNAs. Ao se alimentar da planta transgênica, o inseto-alvo ingere os siRNA capazes de se hibridizar a transcritos vitais ao inseto, os quais serão silenciados, levando o inseto à morte. Essa metodologia permite uma forma de controle específica a determinado organismo por parte da planta.

desenvolveu um milho expressando dsRNAs que tinham por alvo o transcrito da ATPase vacuolar de *D. virgifera*. A ingestão desse milho pelas larvas do coleóptero levaram a uma alta taxa de mortalidade, superando aquela causada pelo milho Bt (milho transgênico expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*), o qual também é empregado para o controle de *D. virgifera*. A demonstração do controle de um inseto-praga através do fornecimento oral de dsRNAs foi um marco para biotecnologia da RNAi aplicada ao melhoramento de plantas de interesse agrônômico.

19.5.2 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

O termo “silenciamento gênico induzido por vírus”, ou VIGS, foi primeiramente empregado por A. Van Kammen em 1997, ao descrever o evento de resistência a infecções virais encontrado em plantas⁸⁵. Plantas infectadas por muitos vírus induzem uma defesa mediada por RNA, a qual tem por alvos RNAs virais e quaisquer outros produtos de RNA transgênico inserido nelas⁸⁶. Devido a essa característica, o mecanismo de VIGS originou uma poderosa ferramenta para suprimir a expressão de genes de interesse em plantas^{87,88}.

Como um método de silenciamento gênico, VIGS tem várias vantagens como, por exemplo: rapidez, supressão transiente da expressão gênica e envolvimento da clonagem de fragmentos curtos do gene-alvo a ser silenciado. Como uma abordagem de genética reversa, VIGS promove o silenciamento dos alvos de uma forma sequência-específica. O mecanismo de silenciamento induzido por sRNAs também age em nível de VIGS, no qual uma sequência de siRNAs de 21 a 25 nt guia uma clivagem específica ou promove a supressão dos mRNAs-alvos pós-transcricionalmente^{2,89}. O processo de silenciamento ocorre da mesma forma como em outros sRNAs, ou seja, os siRNAs são processados a partir de dsRNA por uma enzima DCL, e são então incorporados ao complexo RISC. Desta forma, o complexo RISC carregado com siRNAs regula transcritos com sequência contendo alta complementariedade com a sequência do siRNA⁵⁷.

Os dsRNAs podem ser originados em plantas infectadas durante a replicação das fitas simples de sentido positivo de vírus de RNA (ssRNA) no citoplasma⁹⁰. Já dsRNAs de transgenes podem ser gerados a partir da ação de RDRps do hospedeiro⁹¹.

Com o potencial de silenciamento gênico comprovado, alguns vírus começaram a ser modificados a fim de silenciar genes de interesse. O primeiro

vírus a ser modificado foi o *tobacco mosaic virus* (TMV), o qual recebeu um gene da enzima fitoeno dessaturase (*pds*) de *Nicotiana benthamiana*, e efetivamente silenciou esse gene endógeno quando introduzido na planta⁹².

A partir da comprovada eficiência e especificidade observada durante o processo de VIGS, outros vírus começaram a ser modificados, gerando novos vetores virais com potencial uso em plantas. Exemplos destes são: *tobacco rattle virus* (TRV)⁹³, *turnip yellow mosaic virus* (TYMV)⁹⁴, *potato virus X* (PVX)⁹⁵ e *barley strip mosaic virus* (BSMV)⁹⁶.

19.5.3 microRNAs artificiais (amiRNAs)

A construção de cassetes de DNA para expressão de microRNAs artificiais (amiRNAs) tem sido utilizada como uma forma alternativa de silenciamento gênico altamente específico e eficiente em várias espécies de plantas⁹⁷⁻⁹⁹.

Essa metodologia baseia-se na produção de sequências de amiRNAs com 21 nucleotídeos, os quais podem ser geneticamente modificados e atuar como silenciadores específicos de um ou de múltiplos genes. Uma vez selecionado o gene-alvo a ser silenciado, sequências complementares reversas serão escolhidas e introduzidas em estruturas de precursores de miRNAs endógenos ao organismo de interesse. Quando o precursor, contendo as sequências de amiRNA, for introduzido no organismo, a produção desses amiRNAs seguirá a via canônica de processamento de miRNAs.

Plantas transgênicas contendo construções de amiRNA sob o controle de um promotor constitutivo apresentam um processamento preciso do amiRNA, bem como uma repressão específica e eficiente do transcrito-alvo de interesse^{97,99,100}. Em arroz já foi observado que o transgene de amiRNA é estavelmente herdado e permanece ativo nas progênes, demonstrando ter uma ótima aplicação no melhoramento molecular de plantas^{99,100}. Essas características fazem dos amiRNAs uma ferramenta ideal para a repressão de genes de interesse.

19.5.4 Mimetização de alvos (*target mimicry*)

Esta estratégia baseia-se em um mecanismo natural de regulação da expressão gênica encontrado em plantas. Por exemplo, há certos miRNAs que possuem dois tipos de transcritos alvos: um que possui um sítio totalmente complementar à sequência do miRNA, o que levaria à clivagem e

degradação destes; e um segundo alvo que não parecia perfeitamente com a sequência do miRNA, o que ocasionaria apenas uma hibridização sem clivagem deste mRNA. Este segundo mRNA foi denominado de mimetizador de alvo canônico, ou, do inglês, *target mimic*¹⁰¹.

O primeiro caso de mimetização de alvos foi descrito em 2007 em *A. thaliana*, em um trabalho cujos autores observaram que certos miRNAs possuíam alvos que eram degradados e outros aos quais estes miRNAs apenas se ligavam e lá permaneciam sequestrados¹⁰¹. Um exemplo é o caso do transcrito IPS1 (*induced by phosphate starvation1*), que possui um sítio complementar ao microRNA, miR399, com uma incompatibilidade (erro) na região central (de 11 a 13 nt). Embora isso permita que o miR399 ligue-se à IPS1, ele é incapaz de clivar esse alvo, mas, ao mesmo tempo, miR399 está colapsado à IPS1. Dessa forma, PHO2, um alvo genuíno do miR399, acaba escapando da supressão por miR399 até mesmo nos casos em que esse miRNA está presente em altos níveis. Quando a sequência de IPS1 foi mutada, permitindo que miR399 se ligasse com perfeita complementaridade, observou-se a degradação de IPS1.

O mecanismo de mimetização de alvos apoia-se na ideia de que quando vários alvos estão presentes, alguns serão favorecidos em detrimento de outros, e tal fenômeno pode ser governado pela força com que o miRNA se liga ao seu alvo.

19.6 CONCLUSÕES

As pesquisas sobre sRNAs e o mecanismo de RNAi em plantas têm avançado rapidamente desde a sua descoberta nos anos 1990. Esse campo da biologia experimenta uma rápida expansão, e um significativo conhecimento foi sendo acumulado nos últimos anos. Por exemplo, atualmente, várias classes de sRNAs já foram estabelecidas, bem como os fatores e cofatores que estão envolvidos na biogênese e funcionamento desses RNAs. Além disso, o aprimoramento das formas de uso do mecanismo de RNAi, levou ao desenvolvimento de várias ferramentas biotecnológicas para serem aplicadas com o objetivo de silenciar genes de interesse. Neste capítulo reunimos informações sobre as classes mais proeminentes de sRNAs em plantas, bem como uma das metodologias mais amplamente aplicadas para detecção desses sRNAs, a RT-qPCR, além de apresentar um panorama das possibilidades de aplicações de RNAi no ramo do melhoramento molecular de plantas. Contudo, embora o potencial do uso da via de interferência por RNA em plantas já esteja

bem estabelecido, ainda assim existe a necessidade de aprofundar as pesquisas nesse campo. Uma forma é promover ensaios experimentais de longo prazo, a fim de avaliar a influência das culturas transgênicas com RNAi no ambiente onde estão sendo cultivadas, considerando todas as fases do ciclo ecológico, bem como a cadeia alimentar envolvida.

19.7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante os últimos anos, os estudos focados no entendimento do mecanismo de RNAi possibilitaram o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas empregando sRNAs no melhoramento genético de plantas de interesse econômico.

O progresso biotecnológico observado na agroindústria teve como marco inicial plantas modificadas geneticamente com o intuito de obter maior resistência a insetos e herbicidas, seguido da manipulação de plantas para obter cultivares com enriquecimento nutricional. Nessa via, a interferência por RNA tende a levar a um novo grupo de plantas transgênicas, as quais são passíveis de melhorias tanto no que diz respeito a seus sistemas imunes (aumentando a resistência a vírus e patógenos) quanto na redução dos níveis de substâncias nocivas ou tóxicas aos consumidores.

Até o presente momento nenhuma planta contendo RNAi passou dos testes experimentais e foi liberada comercialmente. Entretanto, acredita-se que seja apenas uma questão de tempo, pois muitas culturas estão sendo manipuladas a fim de proporcionar consideráveis benefícios ao consumidor final. Um exemplo disso é o empenho das duas gigantes da produção de sementes, as multinacionais Monsanto e Dupont, que têm como objetivo o emprego de RNAi para a redução de gorduras trans no óleo de soja. A ideia de beneficiar diretamente a saúde do consumidor certamente auxiliará no crescimento da aceitação do público ao consumo de plantas geneticamente manipuladas.

Outro foco é a manipulação de plantas para a redução dos níveis de toxinas naturais existentes nestas. Por exemplo, sementes de algodão são ricas em proteínas da dieta humana, mas contêm naturalmente gossipol, um terpenoide tóxico, o que as torna impróprias para o consumo humano. Uma alternativa para sobrepujar esse problema seria a aplicação de RNAi a fim de silenciar a enzima delta-cadinene sintetase, a qual é um fator-chave na produção de gossipol. Além disso, a tecnologia de RNAi permite direcionar o silenciamento de uma forma tecido-específica, ou seja, o silenciamento só seria realizado na semente, visto que o gossipol participa da via de defesa

contra pragas do algodão. Seguindo essa linha, outros candidatos a potencial tratamento com RNAi seriam tomates, a fim de reduzir os níveis de alérgenos concentrados no fruto; bem como o tabaco, com redução dos níveis de substâncias carcinogênicas encontradas nas folhas.

Uma das perspectivas mais excitantes na aplicação dos pequenos RNAs na manipulação gênica está chamando a atenção de pesquisadores de todas as áreas, da medicina^{102,103} ao melhoramento de plantas¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. O sistema, chamado de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas e aglomeradas (*cluster regularly interspaced short palindromic repeats* – CRISPR), explodiu em popularidade e está sendo visto como uma ferramenta de pesquisa altamente eficiente e precisa. A tecnologia CRISPR se baseia em uma estratégia de proteção utilizada por bactérias para detectar e remover DNA exógeno. A enzima de restrição Cas9 encontra seu alvo com a ajuda de uma sequência guia de RNA, fazendo com que essa nuclease seja capaz de editar a sequência-alvo. Notavelmente, já se tem demonstrado que as fitas guias de RNA podem ser alteradas, direcionando a ação de Cas9 para genes de interesse. Na área médica, essa tecnologia inovadora, de edição de genes, pretende remover mutações nocivas e trocá-las por DNA saudável, o que significaria a cura de inúmeras doenças causadas por SNPs. Testes em plantas já estão sendo iniciados, e recentemente um grupo da Universidade da Pensilvânia, testando a aplicação desse sistema em arroz, demonstrou que o sistema CRISPR-Cas pode ser explorado como uma poderosa ferramenta para atingir genes-alvos via pequenos RNAs guias e realizar precisa edição no genoma de plantas¹⁰⁵.

Por último, outro ponto relevante a ser considerado quando do uso da tecnologia de RNAi é o risco de efeito *off-target*, isto é, de um sRNA silenciar outro transcrito diferente daquele para o qual foi projetado. No entanto, uma cuidadosa projeção dos transgenes que serão utilizados e a escolha de promotores tecidos-específicos podem diminuir este risco.

Apesar da recente descoberta, não há dúvidas de que a tecnologia que emprega o silenciamento através de sRNA é uma das ferramentas biotecnológicas mais promissoras para o melhoramento de plantas nos próximos anos.

REFERÊNCIAS

1. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990 Apr;2(4):279-89.
2. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
3. Chen CJ, Liu Q, Zhang YC, Qu LH, Chen YQ, Gautheret D. Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus. *RNA Biol*. 2011 May-Jun;8(3):538-47.
4. Ecker JR, Davis RW. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Aug;83(15):5372-6.
5. Van Blokland R, Van der Geest N, Mol J, Kooter J. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J* 1994;6:861-77.
6. Covey S, Al-Kaff N, Lángara A, Turner D. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 1997;385 (6619):781-2.
7. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*. 1997 Jun 6;276(5318):1558-60.
8. Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995 May 19;81(4):611-20.
9. Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA. Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. *Cell*. 1997 Aug 8;90(3):479-90.
10. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):356-63.
11. Llave C. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci*. 2010 Dec;15(12):701-7.
12. Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*. 2010 Mar;11(3):204-20.
13. Lee TF, Gurazada SG, Zhai J, Li S, Simon SA, Matzke MA, et al. RNA polymerase V-dependent small RNAs in *Arabidopsis* originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics*. 2012 Jul;7(7):781-95.
14. Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Jun;21(3):367-76.
15. Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):364-70.

16. Pontes O, Li CF, Costa Nunes P, Haag J, Ream T, Vitins A, et al. The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):79-92.
17. Zheng X, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK. Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J*. 2007 Mar 21;26(6):1691-701.
18. Jamalkandi SA, Masoudi-Nejad A. Reconstruction of Arabidopsis thaliana fully integrated small RNA pathway. *Funct Integr Genomics*. 2009 Nov;9(4):419-32.
19. Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*. 2005 Dec 29;123(7):1279-91.
20. Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A Jr., Zhu JK, et al. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 21;103(47):18002-7.
21. Xie Z, Qi X. Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1779(11):720-4.
22. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):862-4.
23. Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol*. 2002 Sep 3;12(17):1484-95.
24. Reinhart BJ, Bartel DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*. 2002 Sep 13;297(5588):1831.
25. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D109-11.
26. Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*. 2006;342:129-38.
27. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D140-4.
28. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D154-8.
29. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;39(Database issue):D152-7.
30. Yang T, Xue L, An L. Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science*. 2007;172:423-32.
31. Lelandais-Briere C, Sorin C, Declerck M, Benslimane A, Crespi M, Hartmann C. Small RNA diversity in plants and its impact in development. *Curr Genomics*. Mar;11(1):14-23.

32. Lelandais-Briere C, Sorin C, Declerck M, Benslimane A, Crespi M, Hartmann C. Small RNA diversity in plants and its impact in development. *Curr Genomics*. 2010 Mar;11(1):14-23.
33. Liu Q, Chen Y-Q. Insights into the mechanism of plant development: interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;384:1-5.
34. Chuck G, Candela H, Hake S. Big impacts by small RNAs in plant development. *Curr Opin Plant Biol*. 2009 Feb;12(1):81-6.
35. Katiyar-Agarwal S, Jin H. Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol*. Sep 8;48:225-46.
36. Lu YD, Gan QH, Chi XY, Qin S. Roles of microRNA in plant defense and virus offense interaction. *Plant Cell Rep*. 2008 Oct;27(10):1571-9.
37. Lu XY, Huang XL. Plant miRNAs and abiotic stress responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Apr 11;368(3):458-62.
38. Shukla LI, Chinnusamy V, Sunkar R. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1779(11):743-8.
39. Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2004 Aug;16(8):2001-19.
40. Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, Van de Peer Y. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 3;101(31):11511-6.
41. Wang XJ, Reyes JL, Chua NH, Gaasterland T. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol*. 2004;5(9):R65.
42. Wang JF, Zhou H, Chen YQ, Luo QJ, Qu LH. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1688-95.
43. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:19-53.
44. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
45. Faller M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1779(11):663-7.
46. Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*. 2006 Feb;12(2):206-12.
47. Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, et al. Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *Plant Cell*. 2008 Dec;20(12):3186-90.
48. Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J*. 2006 Apr;46(2):243-59.

49. Song QX, Liu YF, Hu XY, Zhang WK, Ma B, Chen SY, et al. Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing. *BMC Plant Biol.* 2011;11:5.
50. Song L, Han MH, Lesicka J, Fedoroff N. Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 27;104(13):5437-42.
51. Ramachandran V, Chen X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science.* 2008 Sep 12;321(5895):1490-2.
52. Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science.* 2005 Feb 11;307(5711):932-5.
53. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol.* 2005 Aug 23;15(16):1501-7.
54. Bollman KM, Aukerman MJ, Park MY, Hunter C, Berardini TZ, Poethig RS. HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development.* 2003 Apr;130(8):1493-504.
55. Chen X. MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* 2005 Oct 31;579(26):5923-31.
56. Guo L, Lu Z. Global expression analysis of miRNA gene cluster and family based on isomiRs from deep sequencing data. *Comput Biol Chem.* 2009 Jun;34(3):165-71.
57. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97.
58. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215-33.
59. Guo L, Lu Z. Global expression analysis of miRNA gene cluster and family based on isomiRs from deep sequencing data. *Comput Biol Chem.* Jun;34(3):165-71.
60. Manavella PA, Hagmann J, Ott F, Laubinger S, Franz M, Macek B, et al. Fast-Forward Genetics Identifies Plant CPL Phosphatases as Regulators of miRNA Processing Factor HYL1. *Cell.* Nov 9;151(4):859-70.
61. Dalmay T, Horsefield R, Braunstein TH, Baulcombe DC. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J.* 2001 Apr 17;20(8):2069-78.
62. Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 10;97(21):11650-4.
63. Fang Y, Spector DL. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol.* 2007 May 1;17(9):818-23.

64. Mourrain P, Beclin C, Vaucheret H. Are gene silencing mutants good tools for reliable transgene expression or reliable silencing of endogenous genes in plants? *Genet Eng (N Y)*. 2000;22:155-70.
65. Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol*. 2003 Apr 29;13(9):784-9.
66. Kim S, Yang JY, Xu J, Jang IC, Prigge MJ, Chua NH. Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary MicroRNAs. *Plant Cell Physiol*. 2008 Nov;49(11):1634-44.
67. Yu B, Bi L, Zheng B, Ji L, Chevalier D, Agarwal M, et al. The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10073-8.
68. Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):669-87.
69. Lu C, Fedoroff N. A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell*. 2000 Dec;12(12):2351-66.
70. Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, et al. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol Cell*. 2004 Oct 8;16(1):69-79.
71. Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, et al. Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Curr Biol*. 2006 May 9;16(9):939-44.
72. Talmor-Neiman M, Stav R, Klipcan L, Buxdorf K, Baulcombe DC, Arazi T. Identification of trans-acting siRNAs in moss and an RNA-dependent RNA polymerase required for their biogenesis. *Plant J*. 2006 Nov;48(4):511-21.
73. Cole C, Sobala A, Lu C, Thatcher SR, Bowman A, Brown JW, et al. Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA*. 2009 Dec;15(12):2147-60.
74. Hsieh LC, Lin SI, Shih AC, Chen JW, Lin WY, Tseng CY, et al. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant Physiol*. 2009 Dec;151(4):2120-32.
75. Hackenberg M, Huang PJ, Huang CY, Shi BJ, Gustafson P, Langridge P. A comprehensive expression profile of microRNAs and other classes of non-coding small RNAs in barley under phosphorous-deficient and -sufficient conditions. *DNA Res*. Apr;20(2):109-25.
76. Loss-Morais G, Waterhouse PM, Margis R. Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets. *Biol Direct*. 8:6.

77. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000 Oct;25(2):169-93.
78. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*. 2005 Oct;39(4):519-25.
79. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 2010 Apr;50(4):244-9.
80. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559-82.
81. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(12):e103.
82. Kulcheski FR, Marcelino-Guimaraes FC, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV, Margis R. The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. *Anal Biochem*. 2010 Nov 15;406(2):185-92.
83. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
84. Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2007 Nov;25(11):1322-6.
85. Van Kammen A. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science*. 1997;2(11):409-11.
86. Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*. 2001 17(8):449-59.
87. Baulcombe D. Fast forward genetics based on virus induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*. 1999;2(2):109-13.
88. Dinesh-Kumar S, Anandalakshmi R, Marathe R, Schi M, Liu Y. Virus-induced gene silencing. *Methods in Molecular Biology*. 2003;236:287-94.
89. Klahre U, Crété P, Leuenberger S, Iglesias V, Meins FJ. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(18):11981-6.
90. Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet*. 2001 Aug;17(8):449-59.
91. Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe D. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*. 2000;101(5):543-53.
92. Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1679-83.

93. Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* 2002 May;30(4):415-29.
94. Pflieger S, Blanchet S, Camborde L, Drugeon G, Rousseau A, Noizet M, et al. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a 'one-step' TYMV-derived vector. *Plant J.* 2008 Nov;56(4):678-90.
95. Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, et al. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 2003 Nov 3;22(21):5690-9.
96. Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue GP. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J.* 2002 May;30(3):315-27.
97. Khraiweh B, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W. Specific gene silencing by artificial MicroRNAs in *Physcomitrella patens*: an alternative to targeted gene knockouts. *Plant Physiol.* 2008 Oct;148(2):684-93.
98. Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2006 May;18(5):1121-33.
99. Warthmann N, Chen H, Ossowski S, Weigel D, Herve P. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS One.* 2008;3(3):e1829.
100. Zhou M, Luo H. MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering. *Plant Mol Biol.* 2013 Sep;83(1-2):59-75.
101. Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet.* 2007 Aug;39(8):1033-7.
102. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, et al. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science.* 2014 Jan 3; 343(6166): 84-87.
103. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR/Cas9 System. *Science.* 2014 Jan 3; 343(6166): 80-84.
104. Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013 Aug;31(8):686-8.
105. Xie K, Yang Y. RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR-Cas System. *Mol Plant.* 2013 Nov;6(6):1975-83.
106. Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods.* 2013;9(1):39.

ENFOQUE BIOTECNOLÓGICO PARA O CONTROLE DE VÍRUS DE PLANTAS

Paolla Mendes do Vale de Abreu
Aline Brito Vaz
Patrícia Machado Bueno Fernandes

20.1 INTRODUÇÃO

Vírus de planta causam grandes prejuízos econômicos e ambientais. Estima-se que a perda mundial chegue a bilhões de dólares por ano. Barreiras fitossanitárias, além de serem uma questão de saúde pública, é uma estratégia de controle de mercado e estabelecimento de preços. Um dos principais fatores limitantes da produção é a suscetibilidade das plantas às viroses, o que resulta em menor rendimento e má qualidade dos produtos.

Como outros vírus, os vírus que infectam plantas são parasitas intracelulares obrigatórios e, portanto, não possuem a maquinaria molecular necessária para replicar seu genoma sem a célula hospedeira. Eles têm genoma pequeno, com um número limitado de genes que codificam para poucas proteínas virais. A grande maioria das viroses de plantas possui genoma de ácido ribonucleico (RNA) positivo*, embora também existam genomas

* RNA viral positivo: RNA na orientação 5'-3', que pode ser diretamente traduzido em proteínas virais. Nesse caso, o genoma viral pode ser considerado um RNAm viral, podendo ser imediatamente traduzido pela célula hospedeira.

de RNA negativo* e de RNA dupla fita (*double-stranded RNA* – dsRNA). Outras viroses de plantas têm ácido desoxirribonucleico (DNA) como genoma, que pode ser fita simples (*single-stranded DNA* – ssDNA) ou fita dupla (*double-stranded DNA* – dsDNA), e todos eles são envoltos por um capsídeo (capa) proteico.

Durante o processo de infecção, basicamente os vírus replicam seu genoma, formam novas partículas e, então, se movimentam de uma célula a outra e entre os tecidos da planta. Durante a replicação, os vírus precisam sintetizar proteínas virais. Essa síntese ocorre a partir do RNA mensageiro (RNAm) em sentido positivo, que é transcrito com o auxílio de uma enzima polimerase, DNA ou RNA polimerase, dependendo de qual seja o genoma viral (Figura 20.1).

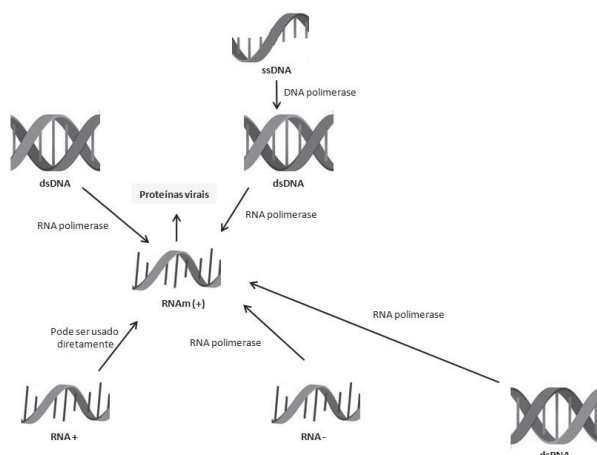


Figura 20.1 Esquema do processo de síntese de proteínas virais durante a replicação. As proteínas virais são sintetizadas a partir do RNA mensageiro sentido positivo. A enzima polimerase, DNA ou RNA polimerase, dependendo de qual seja o genoma viral, auxilia a síntese do RNAm.

O movimento célula-célula ocorre por meio dos plasmodesmos** (Figura 20.2), e o movimento entre órgãos ocorre, principalmente, por meio do

* RNA viral negativo: RNA na orientação 3'-5', sendo complementar ao RNAm viral. O RNA negativo deve ser convertido em positivo (RNAm) por uma polimerase para depois ser traduzido.

** Plasmodesmos são canais de comunicação que permitem o tráfego de macromoléculas entre células adjacentes. Eles são responsáveis pela conexão citoplasmática entre células vizinhas, possibilitando a troca de moléculas de informação, funcionais e estruturais durante o crescimento e o desenvolvimento da planta.

floema¹⁻³. Alguns vírus ainda podem se movimentar utilizando os vasos do xilema⁴.

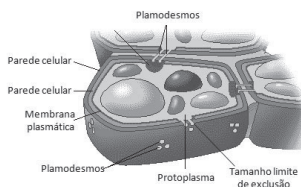


Figura 20.2 Esquema da estrutura dos plasmodesmos. Os plasmodesmos são envolvidos pela membrana plasmática contínua entre as células adjacentes. Eles se estreitam no canalículo que atravessa a parede celular de cada uma das células (tamanho limite de exclusão) e permitem a ligação entre os seus citoplasmas. Fonte: SoBiologia⁵.

O movimento célula-célula do vírus é auxiliado por proteínas de movimento viral, que são capazes de aumentar o tamanho limite de exclusão do plasmodesmo (Figura 20.2), tornando esse processo mais rápido e permitindo, em alguns casos, que o vírus alcance os vasos do floema, onde ocorre o movimento em longa distância para os diferentes órgãos da planta.

Os vírus constituem um dos principais grupos de micro-organismos que causam doenças em plantas, e seu controle nem sempre é eficaz. Por isso, o ideal é prevenir a infecção. Alguns métodos convencionais têm sido utilizados para esse propósito, como a rotatividade de culturas e, especialmente, o controle dos insetos que transmitem o vírus de uma planta a outra. Outro método muito aplicado é a detecção precoce da doença e a destruição das plantas infectadas (*roguing*). Alternativamente, estirpes virais de baixa infectividade podem ser utilizadas para aumentar a resposta de defesa da planta, agindo como uma vacina. No entanto, o uso de cultivares com elevados níveis de resistência* é a estratégia mais viável para reduzir as perdas na colheita⁶. Apesar disso, nem sempre existem cultivares resistentes disponíveis comercialmente. Através da genética clássica, o cruzamento tradicional entre cultivares selvagens permite que a resistência seja introduzida em cultivares comerciais. Entretanto, essa estratégia pode levar muitos anos até a obtenção de uma variedade viável.

* A resistência genética pode ser definida como a habilidade da planta em prevenir ou retardar o estabelecimento do patógeno em seus tecidos, num processo altamente dinâmico e coordenado.

Assim, o uso de plantas geneticamente modificadas* capazes de impedir a replicação e/ou o movimento do vírus na planta é a melhor estratégia antiviral.

No transcorrer do processo evolutivo, as plantas e os patógenos desenvolveram estratégias de sobrevivência, as plantas procurando impedir a infecção e os patógenos driblando essa resistência. Avanços no entendimento da bioquímica de infecções virais e do sistema natural de defesa das plantas têm resultado em novas tecnologias que eficientemente limitam as doenças causadas por vírus^{7,8}.

20.2 ESTRATÉGIAS PARA RESISTÊNCIA A VIROSES EM PLANTAS

A engenharia genética ofereceu novas perspectivas na resistência contra viroses. A criação de plantas geneticamente modificadas resistentes a vírus teve início em plantas de tabaco expressando o gene para a proteína da cápsula proteica de *tobacco mosaic virus* (TMV)⁹. Essa descoberta levou à produção de várias plantas geneticamente modificadas resistentes a viroses, usando diferentes tipos de genes virais⁶. Esse tipo de resistência é conhecido como resistência derivada do patógeno (do inglês *pathogen-derived resistance* – PDR). No entanto, atualmente, a resistência mediada por RNA, baseada no silenciamento pós-transcricional do gene (do inglês *post-transcriptional gene silencing* – PTGS), é a estratégia mais importante no desenvolvimento de plantas resistentes a viroses.

20.2.1 Resistência derivada do patógeno (PDR)

Essa técnica consiste em inserir um ou mais genes do patógeno na célula da planta, gerando resistência específica no hospedeiro. Dessa forma, plantas hospedeiras expressando transgenicamente genes que codificam para proteínas da cápsula viral (do inglês *coat protein* – CP), para proteína de movimento viral (do inglês *movement protein* – MP) ou para subunidades da replicase viral são resistentes a esses vírus¹⁰.

A resistência adquirida pela expressão transgênica da CP em plantas está baseada no bloqueio da remontagem do vírus invasor¹¹. A resistência mediada por CP (do inglês *coat protein mediated resistance* – CPMR) já foi,

* Organismos geneticamente modificados (OGM) são aqueles que tiveram seu genoma modificado mediante emprego de técnicas de engenharia genética. A tecnologia permite que genes individuais selecionados sejam transferidos de um organismo para outro, inclusive entre espécies não relacionadas.

por exemplo, conseguida em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*) e mamão (*Carica papaya*) expressando, respectivamente, a CP do *tobacco mosaic virus* (TMV)¹², a do *potato mosaic virus* (PVY) e a do *papaya ringspot virus* (PRV)¹³. A CPMR, no entanto, pode ser ampla ou restrita. No caso das plantas de tabaco, a resistência foi conseguida apenas contra estirpes de TMV cujas sequências genômicas eram muito similares entre si, enquanto contra estirpes com maiores diferenças no genoma a resistência foi consideravelmente menor¹². Para plantas de mamão, a resistência por CP contra o PRV funcionou apenas para uma única estirpe viral¹⁴.

A resistência mediada por replicase (do inglês *replicase mediated resistance* – Rep-MR) pode ser adquirida pela expressão de transgenes que codificam para sequências completas ou parciais da enzima polimerase do vírus. A Rep-MR contra TMV, por exemplo, ocorreu em plantas geneticamente modificadas que codificavam para um fragmento proteico de 54 KDa da replicase viral¹⁵. Os mecanismos envolvidos nessa resistência não são bem entendidos, mas acredita-se que a replicase produzida pelo transgene interfere de alguma maneira com aquela produzida pelo vírus, ligando-se a fatores do hospedeiro ou a proteínas virais envolvidas na regulação da replicação viral. Já foi relatado que plantas expressando replicase transgênica inibem a replicação do vírus invasor e, em muitos casos, a resistência ocorre mesmo quando a planta é infectada com uma alta carga viral¹⁰. Geralmente, esta é uma resistência limitada à estirpe viral da qual se obteve a replicase¹⁰.

Na resistência mediada por MP, as proteínas MP transgênica e viral, por possuírem o mesmo domínio proteico, competem para interagir com fatores celulares que promovam e interfiram no movimento do vírus na planta. Assim, o transgene interfere na interação das MP virais com fatores da célula hospedeira, dificultando o movimento célula-célula do vírus¹⁶. A infecção de TMV, por exemplo, foi controlada quando a MP de TMV foi expressa transgenicamente em plantas, mostrando que o movimento viral célula a célula foi impedido¹⁷.

20.2.2 Silenciamento pós-transcricional do gene (PTGS) por siRNAs e miRNAs

Um fenômeno conhecido como silenciamento do RNA ocorre em muitos organismos vivos. Em plantas, esse fenômeno é conhecido como silenciamento pós-transcricional do gene (PTGS) e funciona como um mecanismo natural de defesa contra vírus. Basicamente, a planta reconhece moléculas

de dupla fita de RNA (dsRNA) que são geradas durante a replicação viral e degrada moléculas específicas de RNA do vírus, impedindo a síntese de novas proteínas virais e, assim, o progresso da infecção¹⁷⁻²⁰.

A célula, ao perceber a presença do dsRNA viral, destrói moléculas de RNA cuja sequência seja idêntica à do dsRNA. Inicialmente, essas moléculas são clivadas por proteínas denominadas DICER em moléculas menores de 21 a 26 nucleotídeos (nt) (do inglês *small interfering RNA* – siRNAs). Uma das fitas do siRNA é guiada por duas proteínas que trabalham juntas, o complexo de silenciamento induzido por RNA (do inglês *RNA induced silencing complex* – RISC) e a argonauta (AGO), para degradar o RNA mensageiro (RNAm) viral que lhe seja complementar, impedindo a replicação e a propagação do vírus na planta²¹ (Figura 20.3).

Outras moléculas de pequenos RNAs são importantes na interação pató-

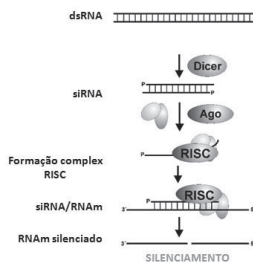


Figura 20.3 Esquema de imunidade antiviral baseada no RNA desencadeada por moléculas de dsRNA virais. No citoplasma, as moléculas de dsRNA virais são processadas pela enzima DICER em moléculas de siRNA. Uma das fitas do siRNA é guiada pelo RISC, em associação com a proteína AGO, a uma molécula de RNAm-alvo viral sequência-específica. A proteína AGO, então, cliva o RNAm, promovendo o seu silenciamento e impedindo o progresso da infecção viral. Fonte: Gene-quantification²².

geno-hospedeiro. Recentemente muitos microRNAs (miRNAs), moléculas de 21 a 24 nucleotídeos codificados por vírus, foram identificados²³, sendo responsáveis pela regulação de vários genes de replicação viral bem como de genes envolvidos na resposta de defesa do hospedeiro²³⁻²⁸. Em plantas, os miRNAs estão envolvidos na regulação de RNAs que codificam para importantes fatores regulatórios do desenvolvimento, de resposta a estresse e de defesa contra patógenos^{29,30}.

Basicamente, os miRNAs são derivados do processamento de longas moléculas de miRNA primário (*primary miRNA* – pri-miRNA), moléculas de dsRNA que formam uma estrutura em grampo³¹. Posteriormente, os

pri-miRNAs são incorporados ao RISC. miRNA-RISCs podem, então, regular RNAs-alvos, que podem ser completa ou parcialmente complementares ao miRNA. Isto resulta na destruição do RNA ou no impedimento da tradução do RNA em proteína^{32,33} (Figura 20.4).

Também já foi sugerido que miRNAs presentes nas plantas podem ter

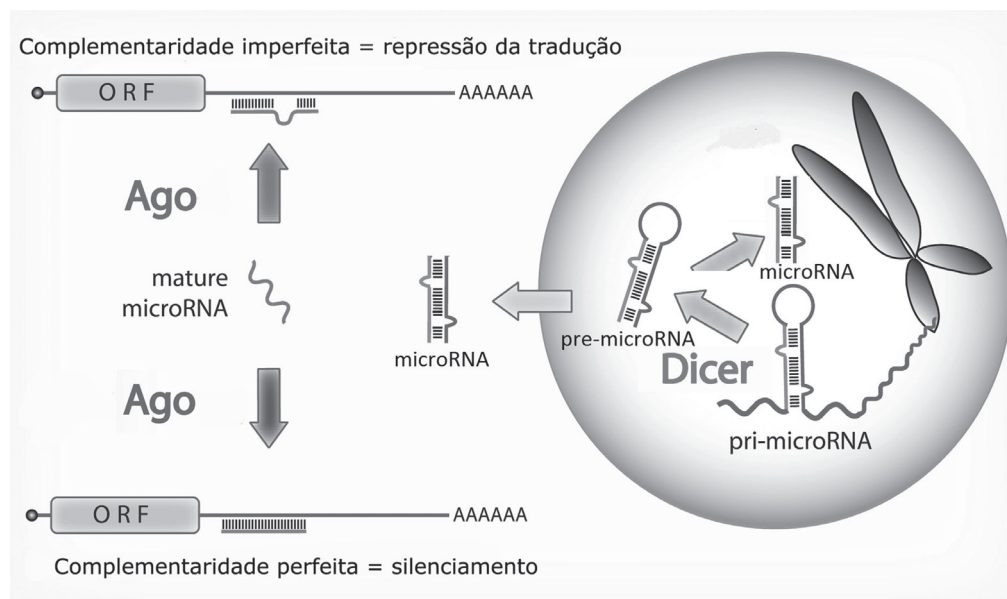


Figura 20.4 Formação de miRNAs e a regulação da expressão gênica. As moléculas de miRNA são primeiramente expressas no núcleo como moléculas primárias de miRNA (pri-microRNA), que são processadas pela enzima DROSHA em precursores de miRNA (pré-microRNA). Estes são levados ao citoplasma, com o auxílio de proteínas de exportação presentes na membrana nuclear. No citoplasma, os pré-microRNAs são processados pela DICER em moléculas maduras de miRNA, de aproximadamente 21-25 nt. O miRNA é guiado a uma molécula de RNA-alvo complementar. Dependendo da complementaridade, pode ocorrer a repressão da tradução ou o silenciamento do RNA-alvo.

como alvo genomas virais, funcionando, portanto, como um mecanismo de defesa antiviral. Uma análise por bioinformática mostrou que vários miRNAs têm capacidade de ter como alvo genomas de vírus invasores em plantas³⁴. Os resultados mostram que genes virais que codificam para a proteína da cápsula viral, por exemplo, são um dos alvos dos miRNAs das plantas. Isso demonstra que a via do miRNA é um suporte ao mecanismo de defesa antiviral desencadeado por siRNAs³⁴.

* Disponível em <http://www.microrna.ic.cz/obr/image023.png>.

Baseado nesses mecanismos naturais de defesa, desencadeados por siRNAs ou miRNAs, é possível promover a degradação de moléculas específicas de RNA (da planta ou viral) por meio da expressão de transgenes que possuem a mesma sequência do RNA que se pretende degradar. No caso de transgenes virais, isso resulta em plantas geneticamente modificadas resistentes a vírus.

A aplicação da tecnologia de engenharia genética é uma alternativa efetiva para controlar doenças causadas por vírus em plantas usando PTGS. Entretanto, ainda existe uma grande preocupação pública quanto à segurança do uso de plantas geneticamente modificadas na agricultura⁶. Assim, atualmente, diferentes metodologias têm sido aplicadas para que a resistência baseada no PTGS seja alcançada sem a modificação genética da planta. Esse tipo de resistência é alcançada pela expressão transiente* de genes de interesse exógenos. Isso tem sido feito pelo bombardeamento das células da planta com partículas de ouro ou de tungstênio carregando moléculas de dsRNA ou siRNA. Outro método é o uso de silenciamento do gene induzido por vírus (do inglês *virus-induced gene silencing* – VIGS). Os VIGS são vetores com a sequência completa do RNA de um determinado vírus construídos *in vitro*, em que sequências exógenas podem ser inseridas. Assim, quando esse vetor é usado para infectar plantas, a sequência inserida induz e se torna alvo do PTGS³⁵. Já foi relatado que moléculas de dsRNA de origem viral, ao serem introduzidas artificialmente nas plantas por inoculação mecânica, desencadeiam uma resposta de defesa induzida por RNA, prevenindo a infecção^{19,20}. Essa mesma resposta de defesa pode ser conseguida quando as plantas são borrifadas com uma solução contendo moléculas de dsRNA viral^{19,36}. Usando essa tecnologia, plantas de *Nicotiana benthamiana* borrifadas dias antes da inoculação viral com dsRNA de *pepper mild mottle virus* (PMMoV), preveniram a infecção por esse vírus¹⁹. Da mesma maneira, plantas de milho (*Zea mays*) preveniram a infecção por *sugarcane mosaic virus* (SCMV)³⁶.

Apesar dessa resposta da planta, baseada no silenciamento transiente de genes específicos, durar poucos dias, acredita-se que os siRNAs produzidos durante o PTGS se movimentam por meio dos plasmodesmos e/ou do floema, desencadeando um silenciamento sistêmico na planta pela degradação de RNA em células distantes.

* Expressão transiente é aquela em que um determinado gene de interesse é expresso por um curto período de tempo na célula, sem que haja a manipulação genética da planta. Dessa forma, o transgene não é integrado ao cromossomo e, portanto, não é passado para as próximas gerações como ocorre na transformação por engenharia genética.

20.3 FERRAMENTAS QUE AUXILIAM O DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE PLANTAS RESISTENTES

Algumas ferramentas usadas na biologia molecular são chaves para auxiliar o desenvolvimento tecnológico de plantas resistentes a vírus. Sabe-se que a infecção viral altera o nível e o perfil de expressão dos RNAs mensageiros e de pequenos RNAs (miRNAs e siRNAs) nas plantas. As técnicas de sequenciamento de RNA (RNAseq), o uso de marcadores moleculares e o mapeamento dos microRNAs diferencialmente expressos em plantas saudáveis e infectadas dão base para identificar RNAs (mensageiros ou pequenos) que podem ser usados na engenharia genética para desenvolver plantas resistentes ao vírus que a infecta.

20.3.1 RNAseq

Em plantas, o controle da resposta frente aos estados de estresse biótico e abiótico é mediado pela atividade transcricional de ativação e repressão de genes. A regulação da transcrição depende da ligação de ativadores ou repressores com os elementos do promotor localizados na região 5' de um gene. O conjunto de todos os transcritos derivados de genes produzidos numa célula sob uma determinada condição fisiológica é chamado transcriptoma³⁷.

Desse modo, o estudo e a análise do transcriptoma são fundamentais para compreender a função, estrutura e as interações dos genes envolvidos num determinado processo. Na década de 1990 foram desenvolvidas algumas tecnologias para o estudo de transcriptoma, como os *Northern blots*, microarranjos*, os cDNA-AFLP e a análise serial de expressão de genes (do inglês *serial analysis of gene expression* – SAGE). No entanto, essas tecnologias têm limitações, como níveis de expressão limitados ou a necessidade de conhecer previamente o genoma de estudo³⁸.

A tecnologia RNA-seq surgiu como uma das ferramentas transcriptômicas mais promissoras e fundamenta-se no sequenciamento massivo de DNA complementar (cDNA), que se apoia no desenvolvimento das plataformas de sequenciamento de nova geração (do inglês *next generation sequencing* – NGS) e que tem conseguido superar as limitações das outras tecnologias de amplo uso, como os microarranjos. O RNA-seq possui muitas vantagens, entre as quais se destaca a necessidade de pequenas quantidades de RNA e

* Microarranjo é uma técnica de biologia molecular que permite analisar a expressão gênica de vários genes simultaneamente. Ver animação em <http://www.youtube.com/watch?v=VNstHmNjKhM>.

o fato de que ela permite encontrar a estrutura de éxons, íntrons e locais de *splicing** alternativo, além de possibilitar a identificação das extremidades 5' e 3' dos genes³⁹.

A tecnologia RNAseq encontra-se disponível comercialmente, e existem muitas plataformas disponíveis. A metodologia pode variar segundo a plataforma de sequenciamento, principalmente na construção da biblioteca de cDNA³⁹. A escolha da plataforma mais apropriada depende das particularidades de um determinado projeto; por exemplo, se existe ou não um genoma de referência e o tamanho do fragmento que se deseja obter. Nessa ordem de ideias, se for necessário fazer montagem *de novo*, isto é, sem um genoma de referência, é recomendável escolher uma plataforma que gere leituras maiores para facilitar a montagem do genoma⁴⁰.

Nessa tecnologia, um dos passos fundamentais é a obtenção de um RNA de boa qualidade. Para tanto, o ideal é utilizar reagentes para o isolamento de RNA capazes de capturar a cauda poli-A³⁸.

Os dados obtidos pelo RNA-seq têm uma precisão elevada e podem ser usados para análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês *quantitative polymerase chain reaction* – qPCR)⁴¹. Como exemplo de uso dessa técnica, o trabalho de Gan e colaboradores (2011)⁴² revelou que a variação nos níveis de expressão gênica é bem mais elevada nos genes envolvidos na resposta ao estresse biótico. Além disso, os genes que codificam para proteínas relacionadas à defesa são mais variáveis do que aqueles que codificam para proteínas do metabolismo basal⁴².

O RNA-seq também foi aplicado à análise de perfis transcriptômicos em patógenos de plantas. É o caso de *Phytophthora phaseoli*, agente causal do míldio do feijão. Os resultados mostraram que genes envolvidos na virulência foram superexpressos na interação do patógeno com a planta⁴³. Dessa forma, observa-se que essa ferramenta também é apresenta grande potencial na pesquisa de transcriptomas em patógenos.

20.3.2 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são sequências de DNA que revelam polimorfismos** entre indivíduos geneticamente relacionados. Quando localizados

* *Splicing* é o processo no qual os íntrons do RNA são removidos, permanecendo apenas os éxons, que, juntos, formam o RNA mensageiro.

** Polimorfismo é a variação na sequência de DNA que pode ser utilizada para diferenciar/comparar indivíduos geneticamente relacionados.

próximo a genes de interesse (ligação gênica) a presença de tais polimorfismos pode ser utilizada para inferir a presença de determinado gene. Eles têm sido utilizados, por exemplo, para sinalizar genes de resistência a patógenos. No amendoim, o uso combinado de diferentes marcadores moleculares permitiu o mapeamento de 34 genes de resistência a patógenos⁴⁴.

Os marcadores do tipo *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphic* (RAPD) e *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) foram responsáveis pelo desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos de muitas espécies cultivadas, além da descoberta de genes e de inúmeros estudos de diversidade genética. A vantagem desses marcadores é o grande número de fragmentos gerados e detectados em um único gel, permitindo que haja maior rapidez no mapeamento genético⁴³. De qualquer forma, cada um deles apresenta vantagens e limitações, cobrindo um amplo espectro de aplicações⁴⁵.

O marcador RFLP, por exemplo, foi usado para avaliar a presença de *citrus tristeza virus* (CTV) em plantas do gênero *Citrus*. As amostras utilizadas foram extraídas de plantas com suspeita de infecção e de plantas pré-imunizadas no campo. O marcador foi utilizado para selecionar a presença do gene que codifica para a proteína da cápsula proteica viral (CP). Em amostras em que o vírus estava presente, o perfil eletroforético apresentou três bandas, indicando dois pontos de corte da enzima de restrição. Em amostras sem vírus, apenas duas bandas estavam presentes no gel de eletroforese⁴⁶.

Os marcadores denominados sequências simples repetidas ou microssatélites (*simple sequence repeats* – SSRs) são os mais polimórficos e consistem em pequenas sequências com um a cinco pares de bases que se repetem em série, em número variável (de uma dezena a uma centena de vezes). Geralmente, os microssatélites identificam um único locus no genoma e são frequentemente multialélicos⁴⁷. O SSR apresenta vantagens sobre os demais marcadores baseados em reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction* – PCR), porque são dominantes e facilmente reproduzíveis. SSRs foram usados, por exemplo, para analisar a variação somaclonal* em porta-enxerto de videira, e diferenças genéticas sutis entre genótipos próximos foram detectadas⁴⁸.

* Variação somaclonal é o surgimento de variantes genéticas a partir da cultura de células *in vitro*. Na propagação vegetativa *in vitro* supõe-se que os descendentes sempre serão geneticamente iguais à planta mãe, mas alguns fatores como tempo de cultura, número de subcultivos (quando as plantas são passadas para um novo meio de cultura), fitorreguladores, tipo de explante, genótipo, composição do meio de cultura, nível de ploidia e mosaicismo são considerados agentes capazes de induzir variabilidade *in vitro*. Dessa forma, obtêm-se plantas que serão diferentes da planta mãe,

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam uma ampla capacidade de amostragem do genoma, sendo de grande potencial para a avaliação da diversidade genética, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas quanto para fins práticos em programas de melhoramento genético. Os genótipos são avaliados por meio dos marcadores; as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas e as bandas não comuns, como diferenças. Os resultados são codificados a fim de gerar uma matriz de similaridade ou dissimilaridade⁴⁵ (Figura 20.5).

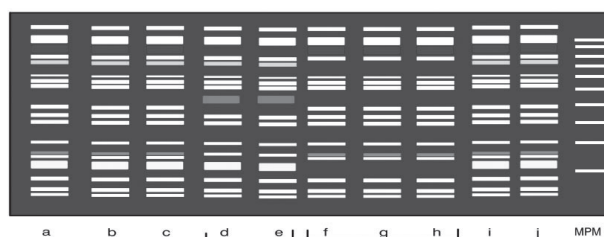


Figura 20.5 Esquema representando resultados imaginários do uso de marcador molecular para comparar dez diferentes amostras de *Arabidopsis thaliana*. As amostras a-c e i-j apresentam o mesmo padrão de bandas, diferente do das amostras d-e e f-h. As amostras d-e não possuem as bandas azul e rosa e possuem uma banda a mais, a vermelha. Já as amostras f-h não possuem a banda verde e amarela. As cores são ilustrativas. Legenda: MPM, marcador de massa molecular. Fonte: DAG – UFLA⁴⁹.

As bandas de interesse geradas pelo marcador molecular podem ser extraídas do gel de eletroforese, e seu DNA, sequenciado. Assim, marcadores moleculares aliados a técnicas de engenharia genética e de sequenciamento de genomas podem ser usados no melhoramento genético de plantas, permitindo aos melhoristas, por exemplo, produzir genótipos mais produtivos e tolerantes a estresses bióticos e abióticos⁴⁸.

20.3.3 Expressão diferencial de miRNAs

Estudos demonstram que a expressão e atividade de miRNAs variam em resposta a estresses bióticos e abióticos em plantas. Plantas modelo de *Arabidopsis thaliana* submetidas a diferentes condições de estresse revelaram

mesmo não havendo reprodução sexuada. Essas plantas são chamadas de variantes somaclonais ou somaclones.

novos miRNAs não detectados em experimentos com plantas condicionadas a ambientes controlados⁵⁰.

Sabe-se que os vírus são capazes de codificar proteínas conhecidas como supressoras do silenciamento, que interferem no acúmulo de miRNAs e siRNAs do hospedeiro⁴¹. Mudanças na expressão de miRNAs têm sido associadas à infecção viral em *Arabidopsis*⁵¹, e a alteração da expressão de miRNAs por proteínas virais parece estar associada ao desenvolvimento de sintomas de doença em *Nicotiana tabacum*⁵². Um estudo encontrou tanto aumento quanto queda na expressão de miRNAs em plantas de tabaco infectadas por diferentes vírus⁵³.

Interessante é que os miRNAs, por exemplo, regulam genes de resistência importantes na planta, como aqueles que codificam para proteínas *nucleotide binding leucine rich repeat* (NB-LRR)⁵⁴, importantes na resposta de defesa da planta a patógenos. Assim, essas pequenas moléculas de RNA são fortes candidatas a serem usadas no desenvolvimento de plantas com resistência antiviral. Definir quais miRNAs são interessantes para esse propósito pode ser um desafio. No entanto, existe no mercado uma espécie de microarranjo de miRNAs que permite mapear a expressão de centenas ou mais miRNAs em uma placa de 96 ou 384 poços (ou chips), dependendo do número de miRNAs analisados. A análise é feita pela PCR em tempo real*, que permite quantificar a expressão dos miRNAs. Isso pode ser utilizado, por exemplo, para mapear miRNAs diferencialmente expressos em plantas saudáveis e infectadas por vírus. Com base nos resultados, é possível selecionar miRNAs cujos alvos estejam envolvidos em respostas de estresse e de defesa antiviral e usá-los no desenvolvimento tecnológico de plantas resistentes. No entanto, essa técnica ainda pode ser de difícil utilização porque não existem placas ou chips para muitos organismos. Assim, dependendo da espécie de planta usada na pesquisa científica, torna-se necessário montar uma placa com os miRNAs que se deseja estudar.

* PCR em tempo real é uma técnica de biologia molecular que combina a metodologia da PCR com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. Ela permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação do DNA sejam realizados em um único experimento.

20.4 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS RESISTENTES A VIROSES

Desde a descoberta da via de silenciamento do RNA, a degradação de moléculas específicas de RNA é um potencial mecanismo para produzir plantas geneticamente modificadas resistentes a algum vírus específico⁵⁵.

Plantas transformadas com RNA viral capaz de formar dupla fita são imunes ao vírus. Isso é possível pela expressão de dsRNAs ou de RNAs em forma de grampo (*hairpin*, Figura 20.6) de origem viral em células da planta. Plantas de tabaco transformadas com o gene viral que codifica para a protease (Pro) de *potato virus Y* em ambas as orientações, positiva e negativa, são imunes a esse vírus. Nesse caso, a imunidade é mais efetiva do que quando esse transgene é expresso em apenas uma das orientações da fita de RNA viral, pressupondo a formação e o reconhecimento de dsRNA viral⁵⁶.

Os miRNAs também podem ser usados para esse propósito. A expressão em plantas de sequências artificiais de miRNAs que têm como alvo genes virais específicos gera plantas resistentes ao vírus em questão. Por exemplo, em plantas de tabaco, a expressão de miRNAs artificiais cujo alvo era o gene que codifica para o supressor do silenciamento 2b de *cucumber mosaic virus* (CMV) inibiu eficientemente a expressão desse gene, conferindo uma resistência efetiva contra CMV⁵⁸.

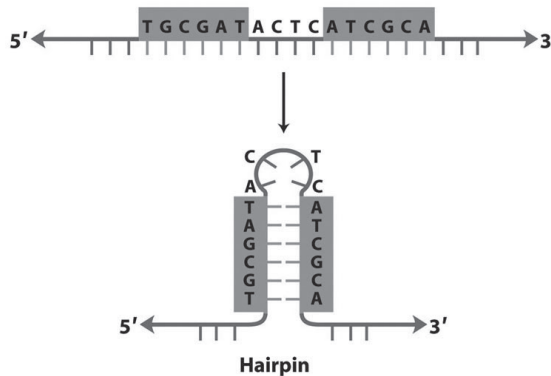


Figura 20.6 Esquema da estrutura de RNA em forma de grampo (*hairpin*). Em plantas, o RNA em forma de grampo pode ser usado para silenciar a expressão de genes-alvos usando a via do PTGS. Fonte: Studyblue⁵⁷.

Devido à simplicidade e à reprodutibilidade do método, a agroinfiltração é um dos métodos mais utilizados na transformação de plantas. Basicamente, a agroinfiltração é a transferência de transgenes de um DNA de transferência (do inglês, *transfer DNA* – T-DNA) da *Agrobacterium tumefaciens* para a célula da planta (Figura 20.7). Assim, esse método permite a coexpressão de diferentes transgenes na mesma célula.

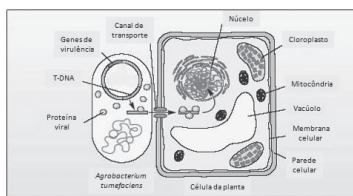


Figura 20.7 Esquema da transformação de plantas por *Agrobacterium tumefaciens*. O plasmídeo da *A. tumefaciens* possui uma região conhecida como T-DNA, que é transferido junto com proteínas de virulência para a planta por meio de um canal de transporte. Dentro da célula vegetal as proteínas de virulência promovem a integração do T-DNA ao genoma da planta. Fonte: IGEM 2010⁵⁹.

O DNA complementar (cDNA) de um determinado RNA viral é colocado em um vetor de expressão sob o controle de um promotor, normalmente o promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus*. Plasmídeos chamados de vetores binários contêm as extremidades do T-DNA, entre as quais o transgene é clonado (Figura 20.8). Esse vetor é usado para transformar *Agrobacterium*.

Os vetores binários foram desenvolvidos para tornar a transformação mais fácil, já que os plasmídeos indutores de tumor (*tumor-inducing* – Ti) de *Agrobacterium* são difíceis de serem manipulados por causa do seu grande tamanho. Dessa forma, foi desenvolvida uma variedade de vetores binários disponíveis para agroinfiltração.

Uma vez que o DNA é uma molécula hidrofílica, ele não passa pela membrana da bactéria. Assim, é necessário tornar a célula bacteriana competente, isto é, capaz de receber o T-DNA com o transgene de interesse. A competência pode ser induzida pelo tratamento com cloreto de cálcio. A membrana da bactéria é permeável a íons cloreto, que, ao entrar na célula, carregam moléculas de água, facilitando a entrada do DNA⁶¹.

Para verificar se as células bacterianas realmente receberam o transgene de interesse, deve ser realizada uma análise pela PCR usando iniciadores específicos para tal transgene. Havendo amplificação, as culturas podem ser preparadas para a infiltração.

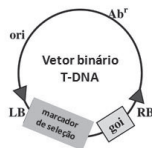


Figura 20.8 Esquema de vetor binário. O vetor binário é usado para introduzir genes em plantas usando a transformação por *A. tumefaciens*. Os genes de interesse (goi) são inseridos na região do T-DNA, delimitados por LB (do inglês *left border*) e RB (do inglês *right border*). O marcador de seleção é usado para indicar o sucesso da transformação. O gene de resistência a antibiótico (Ab^r) é usado para selecionar a presença do vetor na *Agrobacterium*. Legenda: ori, origem de replicação. Fonte: Plant Physiology⁶⁰.

A infiltração pode ser feita pelo método de cocultura⁶². Um explante vegetal é cultivado em um meio de cultura juntamente com a *Agrobacterium* que contém o vetor binário carregando o transgene a ser introduzido na planta. Posteriormente, o explante deverá ser transferido para um meio de regeneração apropriado, contendo antibióticos, geralmente cefotaxima, ampicilina ou carbenicilina, para eliminar as células de *Agrobacterium* que são, a partir desse momento, indesejáveis no meio de cultura. Esse meio deverá conter também um marcador de seleção, geralmente antibiótico ou herbicida, que será responsável pela inibição do crescimento das células da planta não transformadas (Figura 20.8). O efeito nocivo do agente de seleção será anulado pelo produto da expressão do gene marcador de seleção, geralmente uma enzima, nas células transformadas. Assim, somente essas células serão capazes de se regenerar em meio seletivo. Tem-se, por fim, a regeneração de plantas geneticamente modificadas expressando o(s) transgene(s) de interesse para conferir resistência à planta.

20.5 ESTUDO DE CASO: INOCULAÇÃO MECÂNICA DE DSRNA DO VÍRUS DA MELEIRA DO MAMOEIRO (PAPAYA MELEIRA VIRUS – PMEV) EM MAMOEIROS

O vírus da meleira do mamoeiro, *papaya meleira virus* (PMeV), cujo genoma é um RNA dupla fita (dsRNA), é um dos principais que infectam o mamoeiro no Brasil. Esse vírus é responsável por causar uma doença conhecida como “meleira do mamoeiro”, um importante problema fitossanitário na produção de mamão.

Apesar de diferentes genótipos de mamoeiro serem constantemente avaliados em programas de reprodução no Brasil, ainda não existe uma cultivar resistente ao PMeV. Atualmente, a melhor estratégia para controlar a meleira do mamoeiro é a identificação dos sintomas da doença e a subsequente erradicação das plantas afetadas (*roguing*)⁶³.

Uma maneira de induzir resistência antiviral em plantas é introduzir artificialmente moléculas de dsRNA de origem viral, que são capazes de desencadear uma resposta de defesa induzida por RNA^{19,20}. Considerando isso, o dsRNA do PMeV foi usado para inocular mamoeiros infectados. Os resultados mostram um atraso no processo de infecção, sugerindo que a defesa da planta tenha sido elicitada, inibindo a replicação viral⁵⁹. Esse resultado, portanto, é um prospecto para o controle da meleira do mamoeiro.

Até o presente, o PMeV foi observado ocorrendo somente em células do tipo laticíferos⁶⁴, um sistema celular hostil para a grande maioria dos micro-organismos^{65,66}. O dsRNA do PMeV está presente no látex de plantas infectadas em alta concentração e, atualmente, pode ser facilmente extraído com protocolo de extração de ácidos nucleicos usando fenol/clorofórmio⁶⁷. Rodrigues e colaboradores (2009)⁶⁸ mostram que o dsRNA do PMeV se mantém íntegro por um longo período quando o látex de plantas infectadas é diluído em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) e mantido a -20 °C, apontando para importância do uso de um tampão ácido e de baixas temperaturas para manter a integridade do dsRNA viral. Basicamente, para retirar proteínas e manter os ácidos nucleicos, preferencialmente RNA, ao látex diluído em tampão citrato adiciona-se fenol ácido (pH 4,3) e clorofórmio (2:1, v/v) em igual volume. Procede-se à agitação e centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. À solução sobrenadante adiciona-se o mesmo volume de clorofórmio, sempre mantendo as condições de agitação e centrifugação descritas acima. Após isso, transfere-se o sobrenadante para tubos contendo acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol absoluto gelado para que os ácidos nucleicos sejam precipitados e, posteriormente, recuperados. Mantêm-se as amostras armazenadas a -20 °C por, pelo menos, uma noite, e após isso elas são centrifugadas por 50 minutos e colocadas para secar ao ar. Quando secos, os ácidos nucleicos, presentes no fundo do tubo como um precipitado, são ressuspensos em água ultrapura. Assim, tem-se o dsRNA do PMeV, que pode ser usado para inoculação mecânica.

Diferentes métodos de inoculação do PMeV foram usados a fim de avaliar como poderia ocorrer a transmissão desse vírus⁶⁹. Basicamente, o látex coletado de plantas sintomáticas para a meleira foi usado para inocular, por diferentes métodos, plantas sadias. Estas foram avaliadas quanto ao desenvolvimento

dos sintomas e quanto à presença do dsRNA viral. A infecção ocorreu apenas quando o látex foi injetado no ápice do caule⁶⁹. Assim, a inoculação mecânica do dsRNA pode ser feita com uma seringa estéril. Com a agulha faz-se um ferimento no ápice do caule de plantas infectadas, e a solução aquosa contendo o dsRNA é injetada. Uma gota (~ 20 µL) é suficiente.

Após a inoculação de dsRNA viral, é necessário avaliar qual seu efeito no processo de infecção do PMeV em mamoeiros. O método diagnóstico proposto por Rodrigues e colaboradores (2005)⁶⁷ tem a vantagem de ser relativamente rápido e de baixo custo. No entanto, a detecção de ácidos nucleicos pela simples corrida em gel de agarose é limitada. O limite de detecção para uma banda de dsRNA é estimada em 100 ng⁷⁰. Outro método diagnóstico, baseado em transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction* – RT-PCR), foi proposto usando látex de mamoeiro sem a extração prévia de ácidos nucleicos⁷¹. Como a presença do PMeV no látex de mamoeiros é bem estabelecida, ele é usado como primeira escolha na detecção viral. No entanto, o látex de mamoeiros possui uma alta concentração de proteínas⁷², o que pode resultar no baixo rendimento da RT-PCR. Além disso, a forte ligação entre a partícula viral e os polímeros do látex⁷³ pode diminuir a quantidade de dsRNA disponível para a transcrição reversa. Outro ponto importante a ser considerado é que a coleta de látex pode se tornar muito complicada quando se trabalha, por exemplo, com mudas de mamoeiro.

Novos métodos diagnósticos baseados em RT-PCR convencional e em tempo real permitiram a detecção precoce do PMeV em amostras de tecido do mamoeiro⁵⁹. Basicamente, o dsRNA do PMeV é extraído como descrito por Rodrigues e colaboradores (2005)⁶⁷, usando aproximadamente 100 mg de tecido e tampão de extração Doyle⁷⁴. O dsRNA é tratado com DNase I para eliminar qualquer DNA que possa estar ainda presente na amostra e, posteriormente, incubado a 96 °C por três minutos para ser desnaturado. O cDNA é sintetizado usando iniciadores randômicos e a enzima transcriptase reversa, seguindo orientações do fabricante. A amplificação ocorre usando iniciadores específicos para o PMeV⁷⁵.

Usando o método diagnóstico proposto por Abreu e colaboradores (2012)⁷⁵ foi detectada, pela RT-PCR, uma carga reduzida de PMeV apenas 57 dias após a inoculação de dsRNA⁷⁵, o que demonstra que a inoculação de dsRNA do PMeV em mamoeiros retardou o progresso da infecção. A princípio esta é uma resposta de defesa transiente que aponta para o uso de fragmentos do dsRNA viral para induzir uma resposta constitutiva de defesa contra o PMeV.

20.6 CONCLUSÕES

Neste capítulo, mostramos que, apesar de os vírus causarem importantes doenças nas plantas, os diversos métodos utilizados tradicionalmente para prevenir a infecção viral não são eficientes no controle desses patógenos. Assim, apresentamos as principais estratégias biotecnológicas utilizadas no desenvolvimento de plantas resistentes a vírus. Dentre elas, o silenciamento pós-transcricional do gene (PTGS) é um importante caminho para permitir que plantas resistam às infecções virais. O desenvolvimento de plantas modificadas geneticamente é a melhor estratégia para que a resistência antiviral seja efetiva. Alternativamente, a expressão transiente de genes de interesse representa a possibilidade de alcançar a resistência antiviral sem a manipulação do genoma da planta.

20.7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso de plantas geneticamente modificadas ainda é motivo de questionamento no mundo. Em resposta a isso, vários biotecnologistas têm sugerido o uso de tecnologias diferentes da transgenia para o melhoramento das plantas. O objetivo, nesse caso, é escapar do conceito de “organismo geneticamente modificado” (OGM). Assim, as plantas poderiam ser melhoradas geneticamente usando as técnicas de *cisgenesis*, mutagênese dirigida por oligonucleotídeo (do inglês *oligonucleotide-directed mutagenesis* – ODM), nucleases do tipo dedo de zinco (do inglês *zinc-finger nucleases* – ZFN) ou agroinfiltração *sensu stricto*.

Basicamente, em plantas conhecidas como cisgênicas, os genes inseridos são derivados da própria planta ou, no máximo, de espécies sexualmente compatíveis. A ODM é uma alteração (mutagênese) no genoma da planta que afeta a expressão do gene ou altera as propriedades de uma proteína. Essa mutagênese pode ser induzida por químicos ou por radiação. ZFNs são uma combinação de proteínas dedo de zinco que funcionam como fatores de transcrição. O método baseado em ZFNs leva a mutações pontuais, além de permitir a inserção de longas sequências no genoma da planta. Já a agroinfiltração *sensu stricto* é usada para expressar genes exógenos na planta apenas por um período de tempo (expressão transiente). Assim, o transgene não é inserido no genoma da planta, e a progênie permanece livre da sequência exógena⁷⁶.

O objetivo de todas essas técnicas é desenvolver plantas modificadas geneticamente de uma maneira considerada mais natural. No entanto, ainda não há consenso sobre isso, já que a percepção de naturalidade varia entre as pessoas⁷⁷.

REFERÊNCIAS

1. Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(11):849-57.
2. Oparka KJ, Cruz SS. The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2000;51:323-47.
3. Van Bel AJE. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell and Environment*. 2003;26(1):125-49.
4. Kehr J, Buhtz A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(1):85-92.
5. Biologia S. A célula vegetal 2008 [Internet]. [Cited 2014 Jan 8]. Available from: http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia_vegetal/morfovegetal14.php.
6. Vassilakos N. Stability of Transgenic Resistance Against Plant Viruses. In: Çiftçi PYO, editor. *Transgenic Plants – Advances and Limitations: InTech*; 2012. p. 220-36.
7. Berkhout B, Haasnoot J. The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *Febs Letters*. 2006;580(12):2896-902.
8. Buchon N, Vaury C. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity*. 2006;96(2):195-202.
9. Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, et al. Delay of Disease Development in Transgenic Plants That Express the Tobacco Mosaic-Virus Coat Protein Gene. *Science*. 1986;232(4751):738-43.
10. Beachy RN. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997;8(2):215-20.
11. Fuchs M, Gonsalves D. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies. *Annual Review of Phytopathology*. 2007;45:173-202.
12. Nejdat A, Beachy RN. Transgenic Tobacco Plants Expressing a Coat Protein Gene of Tobacco Mosaic-Virus Are Resistant to Some Other Tobamoviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1990;3(4):247-51.
13. Malnoe P, Farinelli L, Collet GF, Reust W. Small-Scale Field-Tests with Transgenic Potato, Cv Bintje, to Test Resistance to Primary and Secondary Infections with Potato-Virus-Y. *Plant Molecular Biology*. 1994;25(6):963-75.
14. Tennant PF, Gonsalves C, Ling KS, Fitch M, Manshardt R, Slightom JL, et al. Differential Protection against Papaya Ringspot Virus Isolates in Coat Protein Gene Transgenic Papaya and Classically Cross-Protected Papaya. *Phytopathology*. 1994;84(11):1359-66.

15. Golemboski DB, Lomonossoff GP, Zaitlin M. Plants Transformed with a Tobacco Mosaic-Virus Nonstructural Gene Sequence Are Resistant to the Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(16):6311-5.
16. Prins M, Laimer M, Noris E, Schubert J, Wassenegger M, Tepfer M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*. 2008;9(1):73-83.
17. Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
18. Pruss GJ, Lawrence CB, Bass T, Li QQ, Bowman LH, Vance V. The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology*. 2004;320(1):107-20.
19. Tenllado F, Martinez-Garcia B, Vargas M, Diaz-Ruiz JR. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *Bmc Biotechnology*. 2003;3.
20. Tenllado FD-R, J. R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *Journal of Virology*. 2001;75:12288-97.
21. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004;431(7006):343-9.
22. Gene-quantification. siRNA mechanism [Internet]. [Cited 2014 Jan 7]. Available from: <http://www.gene-quantification.de/siRNA-mechanism.png>.
23. Singh J, Singh CP, Bhavani A, Nagaraju J. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. *Virology*. 2010;407(1):120-8.
24. Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript (Retracted Article. See vol 451, pg 600, 2008). *Nature*. 2006;442(7098):82-5.
25. Murphy E, Vanicek J, Robins H, Shenk T, Levine AJ. Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: Implications for latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(14):5453-8.
26. Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *Journal of Virology*. 2005;79(12):7371-9.
27. Sullivan CS, Ganem D. MicroRNAs and viral infection. *Molecular Cell*. 2005;20(1):3-7.
28. Triboulet R, Mari B, Lin YL, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K, et al. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*. 2007;315(5818):1579-82.
29. Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. 2004;36(12):1282-90.

30. Chen XM. microRNA biogenesis and function in plants. *Febs Letters*. 2005;579(26):5923-31.
31. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(2):94-108.
32. Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(2):141-8.
33. Guo HL, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-U66.
34. Perez-Quintero AL, Neme R, Zapata A, Lopez C. Plant microRNAs and their role in defense against viruses: a bioinformatics approach. *Bmc Plant Biology*. 2010;10.
35. Watson JM, Fusaro AF, Wang MB, Waterhouse PM. RNA silencing platforms in plants. *Febs Letters*. 2005;579(26):5982-7.
36. Gan DF, Zhang JA, Jiang HB, Jiang T, Zhu SW, Cheng BJ. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Reports*. 2010;29(11):1261-8.
37. Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*. 2002;108(4):501-12.
38. Ward JA, Ponnala L, Weber CA. Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants. *American Journal of Botany*. 2012;99(2):267-76.
39. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57-63.
40. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(2):87-98.
41. Wang MB, Masuta C, Smith NA, Shimura H. RNA Silencing and Plant Viral Diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012;25(10):1275-85.
42. Gan XC, Stegle O, Behr J, Steffen JG, Drewe P, Hildebrand KL, et al. Multiple reference genomes and transcriptomes for *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2011;477(7365):419-23.
43. Kunjeti SG, Evans TA, Marsh AG, Gregory NF, Kunjeti S, Meyers BC, et al. RNA-Seq reveals infection-related global gene changes in *Phytophthora phaseoli*, the causal agent of lima bean downy mildew. *Molecular Plant Pathology*. 2012;13(5):454-66.
44. Leal-Bertioli SCM, Jose ACVF, Alves-Freitas DMT, Moretzsohn MC, Guimaraes PM, Nielen S, et al. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *Bmc Plant Biology*. 2009;9.
45. Guimarães CT, Magalhães JV, Lanza MA, Schuster I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: Borém AC, editor. *Marcadores moleculares*. Viçosa: UFV; 2009. p. 129-75.
46. Valle VGR, Machado MA, Müller GW, Targon MLPN, Teófilo Sobrinho J, Lee RF. Characterization of citrus tristeza closterovirus isolates by RFLP of the coat protein gene. *Fitopatologia Brasileira*. 2000;25:175-81.

47. Pal N, Sandhu JS, Domier LL, Kolb FL. Development and characterization of microsatellite and RFLP-derived PCR markers in oat. *Crop Science*. 2002;42(3):912-8.
48. Caixeta ET, Oliveira ACB, Brito GG, Sakiyama NS. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém AC, editor. *Marcadores moleculares*. Viçosa: UFV; 2009. p. 94.
49. UFLA D-. Marcadores moleculares [Internet]. [Cited 2014 Jan 5]. Available from: [http://www.dag.ufla.br/site/_adm/upload/file/Luciane%20Vilela%20Resende/Marcadores_moleculares1_\[Modo_de_Compatibilidade\]\[2\]](http://www.dag.ufla.br/site/_adm/upload/file/Luciane%20Vilela%20Resende/Marcadores_moleculares1_[Modo_de_Compatibilidade][2]).
50. Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu JH. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*. 2012;1819(2):137-48.
51. Liang G, Li Y, He H, Wang F, Yu DQ. Identification of miRNAs and miRNA-mediated regulatory pathways in *Carica papaya*. *Planta*. 2013;238(4):739-52.
52. Kidner CA, Martienssen RA. The developmental role of microRNA in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005;8(1):38-44.
53. Lang QL, Jin CZ, Lai LY, Feng JL, Chen SN, Chen JS. Tobacco microRNAs prediction and their expression infected with Cucumber mosaic virus and Potato virus X. *Molecular Biology Reports*. 2011;38(3):1523-31.
54. Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(29):12157-62.
55. Ritzenhaler C. Resistance to plant viruses: old issue, news answers? *Current Opinion in Biotechnology*. 2005;16(2):118-22.
56. Waterhouse PM, Graham HW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(23):13959-64.
57. Studyblue. Hairpin structure [Internet]. [Cited 2014 Jan 5]. Available from: <https://www.studyblue.com/#flashcard/view/6008091>.
58. Qu J, Ye J, Fang RX. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *Journal of Virology*. 2007;81(12):6690-9.
59. IGEN. How Agrobacterium Transforms Plants 2010 [Internet]. [Cited 2014 Jan 5]. Available from: http://2010.igem.org/wiki/index.php?title=Team:Nevada/Agrobacterium_Transformations&oldid=193796.
60. Lee LY, Gelvin SB. T-DNA Binary Vectors and Systems: Plant Physiology; 2008 [Internet]. [Cited 2014 Jan 5]. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/146/2/325/F1.expansion>.
61. Annamalai P, Rao AL. Delivery and expression of functional viral RNA genomes in planta by agroinfiltration. *Current Protocols in Microbiology*. 2006.

62. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 1985;227:1229-31.
63. Ventura JA, Costa H, Tatagiba JDS. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI SAMH, editor. *Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management*. London: Klumer Academic Publishers; 2004. p. 201-68.
64. Kitajima EW, Rodrigues CH, Silveira JS, Alves FJL, Ventura JA, Aragão FJL, Oliveira CRB. Association of isometric virus-like particles restricted to laticifers with 'meleira' (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira*. 1993;18:118-22.
65. El Moussaoui A, Nijs M, Paul C, Wintjens R, Vincentelli J, Azarkan M, et al. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001;58(4):556-70.
66. Hagel JM, Yeung EC, Facchini PJ. Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Science*. 2008;13(12):631-9.
67. Rodrigues SP, Galvão OP, Andrade JS, Ventura JA, Fernandes PMB. Simplified molecular method for the diagnosis of Papaya meleira virus in papaya latex and tissues. *Summa Phytopathologica*. 2005;31:281-3.
68. Rodrigues SP, Andrade JS, Ventura JA, Fernandes PMB. New Approach for Papaya Latex Storage without Virus Degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009;40(1):122-4.
69. Rodrigues SP, Andrade JS, Ventura JA, Lindsey GG, Fernandes PMB. Papaya Meleira Virus Is Neither Transmitted by Infection at Wound Sites nor by the Whitefly *Trialeurodes Variabilis*. *Journal of Plant Pathology*. 2009;91(1):87-91.
70. Mcfadden JJP, Buck KW, Rawlinson CJ. Infrequent Transmission of Double-Stranded-Rna Virus-Particles but Absence of DNA Proviruses in Single Ascospore Cultures of *Gaeumannomyces-Graminis*. *Journal of General Virology*. 1983;64(Apr):927-37.
71. de Araujo MMM, Tavares ET, da Silva FR, Marinho VLD, Souza MT. Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2007;146(1-2):305-10.
72. Moutim V, Silva LG, Lopes MTP, Fernandes GW, Salas CE. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Science*. 1999;142(2):115-21.
73. Rodrigues SP, Da Cunha M, Ventura JA, Fernandes PMB. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. *Plant Cell Reports*. 2009;28(5):861-71.
74. Doyle JJDJL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12:13-5.
75. Abreu PMV, Piccin JG, Rodrigues SP, Buss DS, Ventura JA, Fernandes PMB. Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2012;180(1-2):11-7.

76. Brüller W, Hartmann J, Hohegger R, Leonhardt C, Mechtler K, Peterseil V, et al. Cisgenesis: a report on the practical consequences of the application of novel techniques in plant breeding. Vienna: AGES; 2012. 169 p. Disponível em: <http://www.bmgf.gv.at/cms/home/attachments/6/6/0/CH1052/CMS1352183689337/cisgenesis_20121105.pdf>.
77. Miebly H, Sandøe P, Lassen J. Multiple aspects of unnaturalness: are cisgenic crops perceived as being more natural and more acceptable than transgenic crops? *Agriculture and Human Values*. 2013;30:471-80.

APLICAÇÕES DIVERSAS PARA A INDÚSTRIA

TOXINAS INSETICIDAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

André Ballerini Horta
Luiz Eduardo da Rocha Pannuti
Edson Luiz Lopes Baldin
Edson Luiz Furtado

21.1 INTRODUÇÃO

Produzir alimentos com qualidade e em quantidade suficiente para atender ao crescimento populacional tornou-se um dos maiores desafios da humanidade. Essa meta exige o desenvolvimento de tecnologias racionais que otimizem o uso de recursos naturais, ampliando a capacidade produtiva, além de estratégias para redução das perdas de produção.

Insetos, fungos, vírus e bactérias causam severas perdas à produção de alimentos em todo o mundo, e ainda hoje o controle desses agentes é comumente realizado através de defensivos sintéticos. Algumas das moléculas utilizadas no controle de insetos-praga são extremamente tóxicas para organismos não alvo e seu uso incorreto, em muitos casos, é prejudicial à saúde dos animais e seres humanos, induzindo doenças importantes, como câncer e males do sistema imunológico. Além disso, alguns desses compostos são persistentes, sendo degradados lentamente e levando à poluição do solo e da água. A evolução de populações de insetos resistentes a moléculas sintéticas

também resultou na ineficiência dos programas de controle baseados nesses produtos e na ocorrência crescente de surtos de pragas secundárias¹.

Como alternativa ao controle realizado por meio dos inseticidas sintéticos, têm sido desenvolvidos programas de manejo integrado de pragas (MIP), baseados principalmente nos princípios do controle biológico, sendo a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) um dos agentes de controle biológico de maior destaque nesse contexto. Descoberta no Japão em 1902 por Ishiwata, a bactéria foi associada à mortalidade de lagartas de *Bombyx mori* Linnaeus, recebendo primeiramente o nome de *Bacillus sotto*. Posteriormente, na região da Turíngia, na Alemanha, foi relatada por Berliner em 1915, associada à mortalidade de lagartas de *Anagasta kuehniella* Zeller, recebendo a denominação de *Bacillus thuringiensis*^{2,3}. Sua propriedade inseticida foi descoberta quando lagartas de *A. kuehniella* foram encontradas portando esporos e cristais da bactéria. O contato direto com essas estruturas não afetou a mortalidade das lagartas; porém, quando estas ingeriram tais estruturas impregnadas às folhas, as lagartas cessaram a alimentação e posteriormente morreram. A estirpe encontrada por Berliner foi isolada posteriormente, e os resultados observados contra *Ostrinia nubilalis* Hubner foram promissores em ensaios de campo^{4,5}. Esses resultados levaram ao desenvolvimento do produto Sporeine, um inseticida à base de Bt, utilizado para o controle de insetos da ordem Lepidoptera em 1938^{6,7}. O sucesso desse produto resultou em inúmeros outros produzidos à base de Bt ainda comercializados hoje em dia^{3,6}.

B. thuringiensis é uma bactéria de ocorrência cosmopolita, naturalmente encontrada no solo, matéria orgânica, insetos mortos, água e resíduos de grãos, e que se caracteriza pela produção de proteínas inseticidas durante seu processo de esporulação ao final do seu desenvolvimento. Essas proteínas vão sendo acumuladas sob a forma de cristais proteicos no interior das células, os quais são liberados no ambiente, juntamente com os esporos ao final da esporulação. Quando larvas de lepidópteros ingerem esses cristais, as proteínas são solubilizadas no intestino e matam as larvas devido à formação de poros na membrana das células do intestino médio dos mesmos. Essas proteínas distribuem-se principalmente em duas grandes famílias, Cry e Cyt, e há décadas têm sido empregadas com sucesso no controle de pragas agrícolas e vetores de doenças humanas, como malária e dengue. Inicialmente o Bt fazia parte de diversos bioinseticidas e atualmente está presente em culturas geneticamente modificadas (GM)⁸. Outras proteínas produzidas por *B. thuringiensis* continuam sendo identificadas, como é o caso da Vip (proteína inseticida vegetativa). Esse grupo de proteínas foi relatado pela

primeira vez em 1996 e se caracteriza pela atividade inseticida, sendo secreta durante o crescimento vegetativo de estirpes do Bt^{9,10}.

Do mercado global de inseticidas, aproximadamente 2,5% correspondem aos bioinseticidas à base de bactérias, fungos e vírus. Apenas a bactéria *B. thuringiensis* é responsável por 70% desses produtos¹¹. Entretanto, sua utilização na forma de bioinseticida sofre limitações devido ao estreito espectro de ação e à baixa persistência no ambiente. Dessa forma, outra aplicação mais recente e de maior sucesso consiste na expressão de suas proteínas em culturas geneticamente modificadas, conferindo proteção efetiva contra danos causados por insetos⁸.

Em 2015, a área cultivada com culturas GM foi de 179,7 milhões de hectares, distribuída em 28 países. Pelo quarto ano consecutivo os países em desenvolvimento superaram a área plantada pelos países desenvolvidos, ficando com 54% da área cultivada. Aproximadamente 18 milhões de agricultores adotaram os plantios transgênicos, graças aos benefícios socioeconômicos e ambientais. Essa área representa um aumento de cem vezes em relação à área inicial registrada em 1996, tornando a transgenia a tecnologia agrícola mais adotada na história moderna¹².

Os benefícios das culturas GM ao homem e ao meio ambiente são vários, mas os principais estão relacionados ao menor volume de defensivos utilizados após sua adoção, refletindo diretamente no consumo de combustível pelas operações agrícolas, na emissão de gases do efeito estufa e na exposição do trabalhador rural a esses produtos. Até 2012, as culturas de algodão, canola, milho e soja representavam 45% da área total com culturas GM no mundo, e as principais características exploradas eram a resistência a herbicidas específicos e a resistência a insetos-praga¹³.

Em áreas que adotaram cultivos GM desde 1996, houve um decréscimo de 584 milhões de quilos de ingredientes ativos utilizados¹². Considerando-se a adoção de culturas GM resistentes a herbicidas (principalmente glifosato e glufosinato), em algumas regiões, houve um incremento no volume total utilizado, mas o perfil de herbicidas aplicados foi alterado. Adotou-se o uso de produtos mais seletivos e com diferentes modos de ação, a fim de se evitar ou controlar o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes. Assim, mesmo com o maior volume utilizado, o impacto ambiental foi reduzido quando comparado ao manejo convencional. Nas áreas onde culturas GM resistentes a insetos foram adotadas, houve redução no volume total de inseticidas utilizado em todas as culturas. Em 2012, a economia global em ingrediente ativo de inseticidas foi de 40% para a cultura do algodão e de 86,5% para a cultura do milho. Com o menor número de operações necessárias para aplicação

de defensivos, a exposição do trabalhador rural aos produtos e a emissão de dióxido de carbono associada ao consumo de combustível também foram reduzidos. No período de 1996 a 2012, houve economia de 6.268 milhões de litros de combustível ou 16.736 milhões de quilos de dióxido de carbono, o que equivale à retirada de 7,44 milhões de carros das estradas por um ano. As melhorias no cultivo favoreceram o manejo do solo e o sequestro de carbono. Em 2012, estimou-se que 6,707 milhões de quilos de carbono do solo foram preservados, equivalendo a 24.613 milhões de toneladas de dióxido de carbono que não foram liberadas para a atmosfera global, ou 10,9 milhões de carros retirados das estradas por um ano¹³.

Os ganhos em produtividade, a redução das perdas ocasionadas por pragas e a menor utilização de defensivos são os principais fatores responsáveis pelo aumento na adoção das culturas GM em todo o mundo. Para garantir a continuidade desses benefícios, é importante preservar a vida útil dessa tecnologia, visto que já existem relatos da evolução de populações de insetos resistentes ao *B. thuringiensis*, e, para isso, programas de manejo já têm sido empregados.

Muitos estudos têm mostrado que as toxinas Bt utilizadas em culturas transgênicas são seguras ao ambiente e não tóxicas a outros organismos, mas ainda existem preocupações relacionadas ao impacto de produtos Bt aos organismos não alvo. Dessa forma, é importante o completo entendimento a respeito do modo de ação das principais toxinas (Cry, Cyt e Vip) para propor estratégias que sejam efetivas na neutralização e combate da ação dessas toxinas, de modo a proteger organismos ameaçados em ecossistemas particulares. Por outro lado, é sabido que a resistência a essas toxinas é um grande problema que se tornará mais frequente em áreas de cultivo Bt, devido à grande pressão de seleção.

Diante do exposto, abordaremos os avanços na proteção de cultivos ao redor do mundo através da utilização da bactéria *B. thuringiensis*, seja através de bioinseticidas ou como fonte de proteínas inseticidas para organismos geneticamente modificados.

21.2 BACILLUS THURINGIENSIS E SUAS PROTEÍNAS INSETICIDAS

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva de crescimento aeróbio, pertencente à família Bacillaceae. Como dito anteriormente, possui ocorrência cosmopolita, sendo encontrada naturalmente no solo e em outros substratos como superfície de plantas, insetos mortos e grãos armazenados.

Caracteriza-se por sua atividade inseticida relacionada principalmente à presença de cristais proteicos produzidos durante seu processo de esporulação, o qual pode ser induzido por condições adversas como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis no meio^{14,15}. Esses cristais são compostos principalmente por δ -endotoxinas conhecidas como proteínas Cry, as quais possuem ação inseticida contra insetos pertencentes a diversas ordens, mas principalmente Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera^{16,8}. Essas proteínas são codificadas por genes *cry*, os quais são classificados de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos. Atualmente, são conhecidos 74 diferentes grupos de toxinas Cry com mais de 770 sequências de genes já descritos (Figura 21.1)¹⁷.

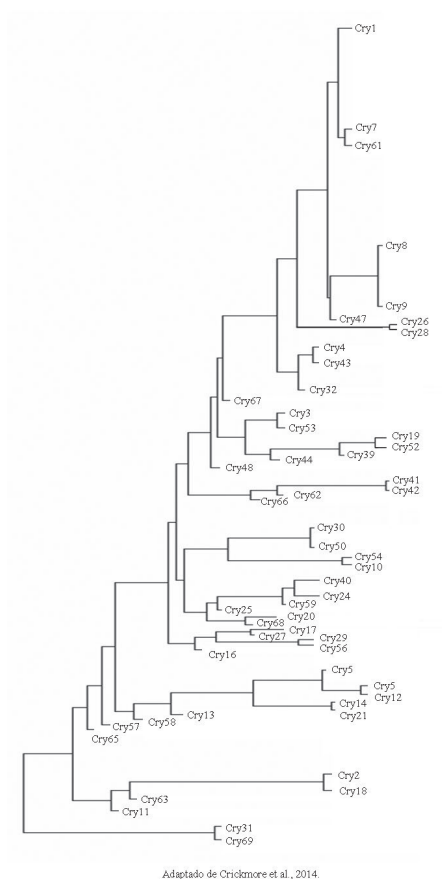


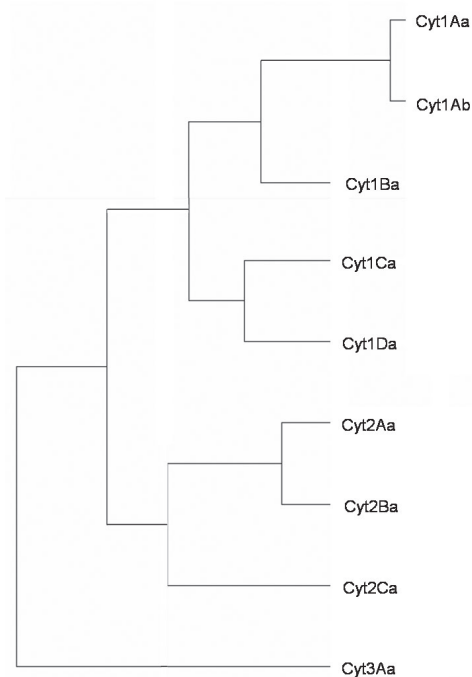
Figura 21.1 Dendrograma de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: Crickmore¹⁷.

É comum uma mesma cepa de *B. thuringiensis* apresentar vários genes *cry* em sua composição genética, sem que necessariamente todos eles sejam expressos e suas proteínas estejam presentes nos cristais⁷.

Outras proteínas com atividade inseticida também são produzidas por *B. thuringiensis*, entretanto, em frequência inferior, sendo elas as proteínas Cyt e Vip.

Proteínas Cyt também são sintetizadas durante o processo de esporulação e podem ser acumuladas juntamente com as toxinas Cry nos cristais. Essas proteínas possuem atividade inseticida quase que exclusiva para insetos da ordem Diptera e geralmente são encontradas em cepas que possuem genes *cry* de mesma especificidade, possuindo ação sinérgica na toxicidade a larvas desses insetos. São conhecidos apenas três grupos, que compreendem menos de 40 genes conhecidos (Figura 21.2)¹⁷.

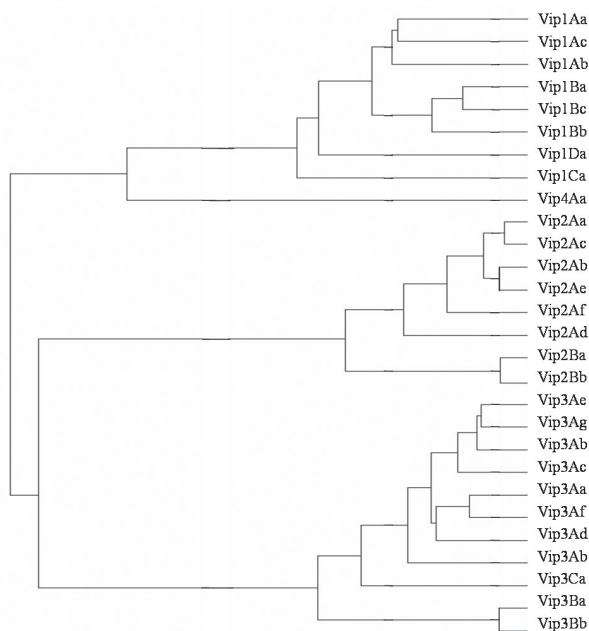
Proteínas Vip são produzidas durante a fase vegetativa de desenvolvimento do *B. thuringiensis*, sendo secretadas pela bactéria no seu meio de desenvolvimento. Quando comparadas às proteínas Cry, possuem espectro



Adaptado de Crickmore et al., 2014.

Figura 21.2 Dendrograma de proteínas Cyt de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: Crickmore¹⁷.

de ação mais amplo. São conhecidas quatro subfamílias dessas proteínas (Vip1, Vip2, Vip3 e, mais recentemente, Vip4), com pouco mais de 140 genes conhecidos (Figura 21.3)¹⁰. Até o momento, as subfamílias Vip1 e Vip2 foram testadas e demonstraram eficiência contra coleópteros¹⁸ e hemípteros¹⁹ (especificamente pulgões), enquanto Vip3 é efetiva contra diferentes insetos da ordem Lepidoptera^{10,20}.



Adaptado de Crickmore et al., 2014.

Figura 21.3 Dendograma de proteínas Vip de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: Crickmore¹⁷.

Outros genes que codificam toxinas com características diferenciadas também podem ser encontrados, mesmo que isso ocorra com frequência muito inferior à dos genes *cry*, *vip* e *cyt*.

São conhecidas α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases e lecitinasas. Algumas dessas possuem atividade comprovada sobre mamíferos, tornando fundamentais estudos para sua detecção principalmente quando o objetivo de utilização de uma cepa é a formulação de um bioinseticida.

A α -exotoxina e as β -exotoxinas tipos I e II são altamente tóxicas para insetos e alguns vertebrados. A α -exotoxina em altas doses possui função enzimática citolítica, atuando sobre fosfolipídeos de membranas em diversos tipos celulares. A β -exotoxina (thuringiensina) é termoestável e atua através da inibição de nucleases, inibindo a síntese de RNA nas células afetadas, razão pela qual seu uso é controlado ou até proibido em alguns países, pois existem estudos que mostraram sua capacidade de criar lesões em tecidos de camundongos e galinhas e ação mutagênica em sistemas fisiológicos de mamíferos^{3,21}. Nesse caso, a detecção de um gene que codifica uma dessas toxinas é fator proibitivo de seu uso para a produção de bioinseticidas.

21.3 MODO DE AÇÃO DAS PRINCIPAIS TOXINAS BT

Como já mencionado anteriormente, *B. thuringiensis* pode ser aplicado na proteção de cultivos seja através da expressão de suas toxinas em plantas transgênicas ou por meio de bioinseticidas. No primeiro caso, o inseto é exposto diretamente à fração ativa da toxina, expressa de maneira constante no vegetal. No segundo caso, com a aplicação de bioinseticidas nas culturas, esporos e cristais de toxinas são dispostos sobre a planta da qual o inseto se alimentará.

Para proteínas Cry em lepidópteros, atualmente são propostos dois modos de ação distintos. O primeiro e clássico é relacionado à fração ativada da toxina. Neste considera-se que após a ingestão dos cristais, estes são solubilizados nas condições de pH alcalino no intestino dos insetos, liberando protoxinas que em presença de proteinases são quebradas, gerando fragmentos tóxicos. Esses fragmentos atravessam a membrana peritrófica ligando-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células do intestino médio. Essa ligação interfere no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana pela formação de poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água de forma descontrolada causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio, levando o inseto à morte (Figura 21.4). O inseto também pode morrer por inanição, pois pouco tempo depois da infecção cessa sua alimentação²².

O segundo modo de ação recentemente comprovado, obtido pela análise da atividade inseticida das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac para populações de insetos resistentes, revelou ainda outro modo de ação distinto do descrito anteriormente. Até então se pensava que a protoxina era uma forma inativa que necessitava ser clivada pelas proteinases para só então gerar fragmentos tóxicos ativos no controle de insetos. Entretanto, os dados recentemente

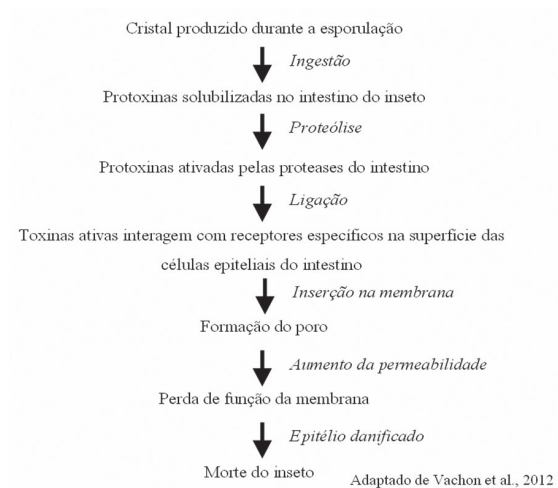


Figura 21.4 Representação esquemática dos passos que levam à formação do poro e morte do inseto, de acordo com o modelo clássico do modo de ação do Bt.

levantados suportam que a protoxina pode ser inclusive mais potente contra insetos resistentes do que sua fração tóxica ativada, ajudando desse modo a aumentar e sustentar a eficácia das culturas Bt¹³⁸ (Figura 21.5).

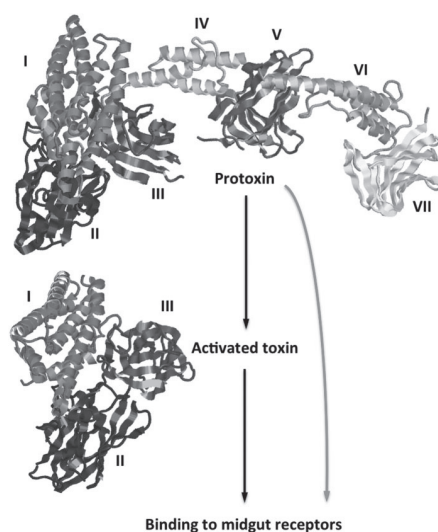


Figura 21.5 Representação esquemática do modo de ação no qual a protoxina se liga diretamente ao receptor na membrana.

O intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui pH elevado, condição desfavorável para a germinação dos esporos ingeridos, mas essencial para a atividade das toxinas. Com a lise das membranas celulares, seguida da ruptura da parede do intestino, o conteúdo do intestino é misturado à hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes, favorecendo a germinação dos esporos e a disseminação da infecção pelo organismo do inseto²³ (Figura 21.6). Com o desenvolvimento da infecção, os sintomas observados além da perda de apetite são: paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, por fim, morte²⁴.

As proteínas Cry possuem duas regiões distintas compostas por protoxinas: a porção aminoterminal (N-terminal) relacionada à toxina ativada após a clivagem pelas proteinases e foco do modo de ação clássico; e a porção carboxiterminal (C-terminal), anteriormente associada somente à formação do cristal¹⁶, agora está relacionada ao segundo modo de ação recentemente descoberto. A porção C-terminal é clivada no intestino do inseto e seus domínios V e VII, similares aos domínios II e III da toxina ativada, se ligam aos mesmos fragmentos de caderina, receptor chave neste processo. A porção N-terminal corresponde a toxina ativada e possui três domínios. O domínio I está associado à inserção da toxina na membrana e à formação de poros^{25,26}. Os domínios II e III são associados à ligação com o receptor, de forma a definir o(s) inseto(s)-alvo da toxina^{26,27}. Os estudos realizados para determinação do modo de ação das proteínas Cry foram realizados principalmente em lagartas de lepidópteros^{16,28}.

De forma geral, os estudos realizados levam em consideração o efeito letal das proteínas Cry sobre um inseto-alvo específico, mas é importante lembrar também que o inseto suscetível, quando exposto à toxina e sofrendo os sintomas da infecção, também fica mais exposto ao ataque de inimigos naturais (predadores e parasitoides), os quais também podem sofrer algum tipo de ação da toxina ingerida pelo inseto-alvo. Além disso, é muito comum a presença de dois ou mais genes *cry* funcionais em um mesmo isolado ou linhagem bacteriana de *B. thuringiensis*, de modo que o cristal por ele produzido conterá duas ou mais proteínas Cry. Logo, a patogenicidade e a virulência conferidas ao isolado são relacionadas diretamente à forma de ação das proteínas nele presentes e à forma como elas interagem. Essa interação entre as toxinas e seus respectivos receptores pode levar a efeitos antagônicos ou sinérgicos. Em estudo conduzido com lagartas de *Lymantria dispar* Linnaeus (Lepidoptera: Lymantriidae) foi observado efeito antagônico entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab e efeito sinérgico entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac²⁹. Os mesmos efeitos da interação entre as toxinas presentes em um

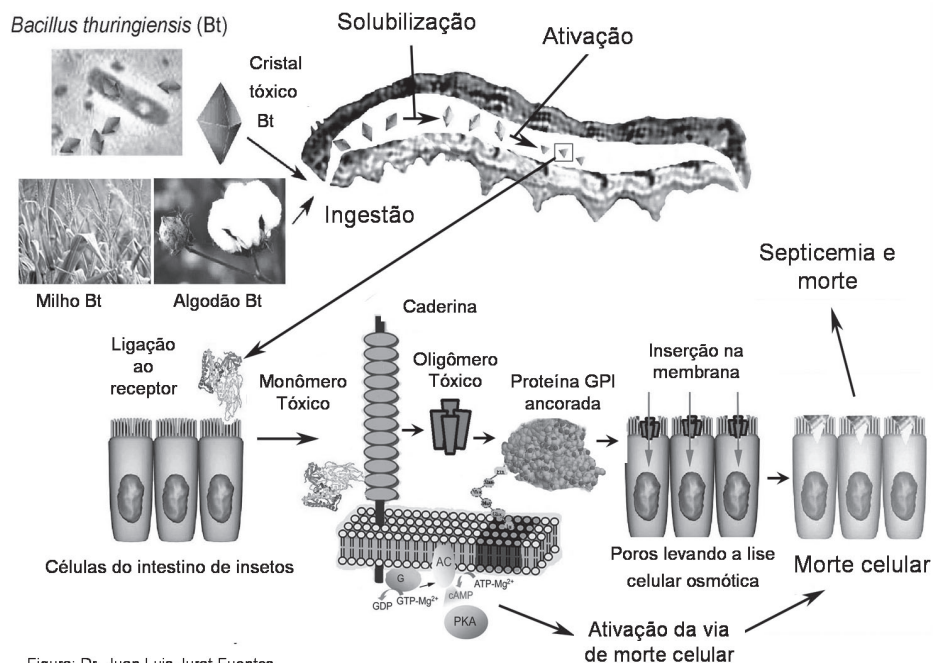


Figura: Dr. Juan Luis Jurat-Fuentes

Figura 21.6 Modo clássico de ação de *B. thuringiensis*. Fonte: Jurat-Fuentes¹³⁹.

isolado podem ser observados para formulações de bioinseticidas. Em estudo conduzido avaliando-se tais interações entre Xentari® e Dipel®, foi observado efeito aditivo para *Heliothis virescens* Fabrícus (Lepidoptera: Noctuidae)³⁰.

O modo clássico de ação das toxinas Cry ainda tem sido revisto e apresenta duas vertentes de estudo. No modelo mais difundido, os pesquisadores descrevem a função de cada um dos três domínios das proteínas Cry e mostram que o domínio I da proteína é responsável pela formação do poro no intestino das larvas e inserção da proteína no intestino das mesmas⁸. O domínio II está envolvido com a ligação das proteínas em receptores de membrana, e sua estrutura é similar a uma série de proteínas que ligam carboidratos. Assim como o domínio II, o domínio III apresenta estruturas similares à de outras proteínas de ligação de carboidrato, como a celulose, que se liga a 1,4 β -glucanase C, galactose oxidase e β -glucoronidase, e com domínios de carboidratos, que se ligam a xylanase V e β -galactosidase³¹ (Figura 21.7). Isso sugere que os carboidratos possuem importante papel na ação dos domínios II e III³².

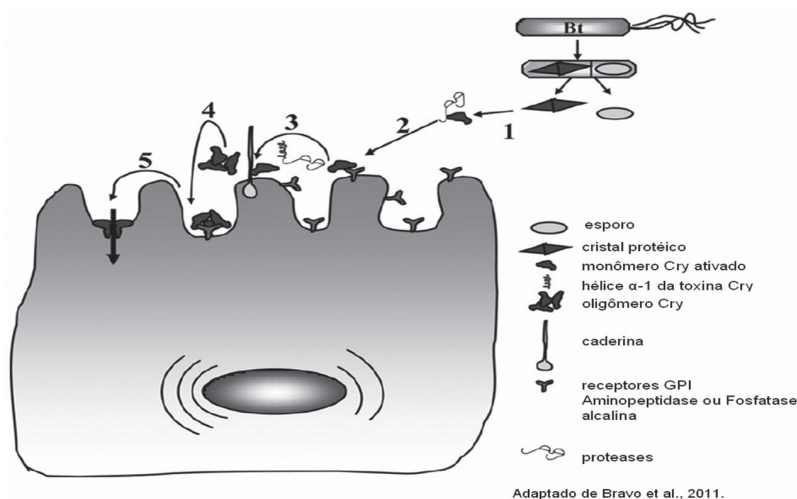


Figura 21.7 Modo de ação das toxinas Cry1A no lepidóptero *M. sexta*. (1) Solubilização e processamento proteolítico da protoxina Cry1A pelas proteases do intestino médio. (2) Ligação do monômero 3D-Cry1A aos abundantes receptores GPI aminopeptidase-N e fosfatase alcalina. (3) Ligação do monômero da toxina Cry1A ao receptor caderina e proteólise adicional da hélice α -1 do domínio I. (4) Formação da estrutura oligomérica e ligação da mesma aos receptores GPI aminopeptidase-N e fosfatase alcalina. (5) Inserção da estrutura oligomérica de Cry1A na membrana.

Em outro modelo de atuação de proteínas Cry, os autores dividem o modelo proposto em dois tipos de interação entre as toxinas Cry e a célula-alvo. Um tipo é baseado na montagem das toxinas Cry como oligômeros que se ligam à célula, mas não a levam à morte. A ligação formada é não específica; portanto, não há interação específica entre a toxina e os componentes da membrana de lipídeos³³. Os dois modelos acima citados são de extrema relevância para o estudo da suscetibilidade de larvas em relação às proteínas Cry.

Proteínas Cry e Cyt pertencem a uma mesma classe, conhecida como proteínas formadoras de poros, sofrendo os mesmos passos tóxicos de solubilização, ativação proteolítica, ligação com o receptor e inserção na membrana de seu hospedeiro, interferindo na homeostase de íons e ocasionando a destruição das células-alvo^{16,34,35}. As toxinas produzidas pelas proteínas Cyt são sintetizadas como protoxinas e solubilizadas no intestino dos insetos suscetíveis, em grande maioria da ordem Díptera, e ativadas proteoliticamente por proteases intestinais, resultando na produção de proteínas ativadas de 25 KDa^{35,36}. Existem dois mecanismos de ação propostos para a inserção dessas toxinas na membrana das células intestinais: uma formação de poros

estruturados em que a toxina Cyt liga-se à membrana celular, induzindo, assim, à formação de canais catiônicos seletivos nas vesículas da membrana e levando à lise coloidal-osmótica da célula^{37,38,35}; ou um modelo de efeito detergente no qual ocorre uma agregação não específica da toxina sobre a superfície da bicamada lipídica da membrana, ocasionando desmontagem e morte das células-alvo^{35,39}.

Acredita-se que as toxinas dessa classe possuem uma atividade sinérgica com outras toxinas contra uma série de insetos-alvo⁴⁰, podendo facilitar a ligação e/ou talvez a internalização da outra toxina, além de apresentar sua toxicidade própria³¹.

Em adição às toxinas formadoras de poros, foi identificada uma nova família de proteínas inseticidas denominada Vip (proteína inseticida vegetativa), produzidas durante seu estágio vegetativo^{41,42}. Vip3 é a subfamília mais difundida e a única com efeito tóxico relatado na base de dados de toxicidade para *B. thuringiensis* do Natural Resources Canadá*. Semelhantes às proteínas Cry, as toxinas dessa família ligam-se a receptores do intestino médio do inseto; porém, não compartilham dos mesmo locais (sítios) de ligação^{10,43,44}. A morte celular (apoptose) foi sugerida inicialmente como o modo de ação; contudo, existem estudos demonstrando que, assim como as proteínas Cry, as toxinas Vip3A ativadas podem ser proteínas formadoras de poros capazes de tornar estáveis os canais iônicos na membrana⁴⁵. A possibilidade de diferentes modos de ação das proteínas Vip ainda é sugerida^{46,47}.

A elucidação do modo de ação das toxinas de Bt possibilitou o uso da combinação das toxinas Cry e Vip como uma importante ferramenta para o controle de diversas pragas na agricultura. Híbridos transgênicos de milho e algodão Bt contendo a combinação das duas proteínas (Vip3Aa e Cry1A) vêm sendo comercializados para o controle de diversos insetos da ordem Lepidoptera⁴⁸. Essa alternativa tem sido considerada promissora no manejo de resistência de insetos¹⁰, uma vez que já existem casos de resistência de populações de insetos a proteínas Cry^{49,50}, ou mesmo ineficiência desta no combate a algumas pragas de importância agrícola⁵¹.

21.4 MANEJO DA RESISTÊNCIA DE INSETOS ÀS TOXINAS BT

A tecnologia das plantas transgênicas resistentes a insetos baseia-se na introdução de genes na planta sem a necessidade de fecundação ou

* Ver <http://cfs-scf.nrcan-rncan.gc.ca/projects/119/2>.

cruzamento, podendo ser transferidas características de plantas sexualmente incompatíveis e outros organismos⁵². A introdução de tais genes confere à planta atividade inseticida para uma ou mais pragas-chave da cultura. Esses genes podem ser obtidos de outros vegetais, animais, insetos e bactérias, e podem codificar a produção de inibidores de enzimas, neuro-hormônios, proteínas com ação inseticida, entre outros compostos com ação diferenciada. Dentre as formas de obtenção de genes para introdução em plantas geneticamente modificadas, a bactéria *B. thuringiensis* é a principal fonte de genes para os transgênicos comercializados atualmente.

No entanto, os benefícios das culturas transgênicas com resistência para insetos estão ameaçados pela seleção de populações de insetos resistentes às toxinas Bt. Como qualquer outra tática de controle, seu potencial de uso por um longo período pode ser limitado se não houver a implementação de estratégias de manejo de resistência apropriadas⁵³.

É importante lembrar que os insetos têm a capacidade de se adaptar para sobreviver às novas adversidades impostas. Assim como no passado eles foram selecionados para os inseticidas sintéticos, hoje já existem relatos de casos de resistência ao modo de ação das toxinas de *B. Thuringiensis*, seja pela utilização de bioinseticidas ou de plantas transgênicas^{49,54,55,56,57,58,59}.

Uma aplicação rápida das técnicas moleculares desenvolvidas a partir da década de 1980 foi introduzir, em plantas, genes que conferem novas características de importância agrônômica. Tolerância a pragas sempre foi um dos desafios dos melhoristas de plantas. Por essa razão, genes de Bt que codificam proteínas inseticidas têm sido transferidos para culturas agromomicamente relevantes, a fim de conferir a elas proteção para seus mais importantes insetos-praga⁶⁰.

Após alguns anos de comercialização de culturas Bt, a maioria das populações de insetos continua suscetível. Os casos que a literatura registra de resistência de populações de insetos às proteínas Bt incluem *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) em milho Cry1F em Porto Rico^{58,59}, *Busseola fusca* Fuller (Lepidoptera: Noctuidae) em milho Cry1Ab na África do Sul⁶¹, *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão Cry1Ac e Cry1Aa nos Estados Unidos, *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) em algodão Cry1Ac na Índia⁶², e *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho Cry3Bb nos Estados Unidos⁶³.

Diversas culturas, como milho, algodão, batata e arroz, têm sido transformados com genes Bt codificando para proteínas altamente ativas contra as mais importantes pragas. Assim, milho Bt tem sido transformado com Cry1Ab,

Cry1F e Vip para proteção contra *Ostrinia nubialis* (Lepidoptera: Crambidae), *Diatraea grandiosella* Dyar (Lepidoptera: Noctuidae), *S. frugiperda* e *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), e com Cry3Bb1, Cry3Bb e Cry34Ab e Cry35Ab para proteção contra pragas de raízes do gênero *Diabrotica* (Coleptera: Chrysomelidae). Muitos dos híbridos produzidos atualmente expressam mais de uma proteína, conferindo resistência a mais de uma ordem de insetos, sendo conhecidos como eventos piramidados⁶⁴.

Muito do algodão Bt plantado comercialmente contém o gene *cry1Ac* ou uma fusão dos genes *cry1Ac* e *cry1Ab*. O gene *cry1Ac* é altamente ativo contra lepidópteros que se alimentam dos capulhos: *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae), e razoavelmente eficaz contra *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae). Na China, o gene inibidor de tripsina em feijão (CpTi) foi combinado com um gene *cry1Ac* para produção de um produto com gene piramidado comercializado no início dos anos 2000. O gene *vip3A* também foi introduzido em algodão e também confere proteção contra as mesmas pragas⁶⁵.

Os genes *cry1Ac* e *cry2Ab* foram combinados na mesma planta (Bollgard II), dando origem à segunda geração de algodão Bt, que é extensivamente plantada na Austrália. Após sua adoção nos Estados Unidos, em 2006, esta apresentou um crescimento considerável na sua área plantada⁶⁶. Outra combinação de genes Bt que tem sido recentemente comercializada agrega os genes *cry1Ac* e *cry1F*, conferindo proteção adicional contra *Spodoptera* spp⁶⁵. A razão para combinar duas ou mais proteínas diferentes não é somente aumentar o espectro de ação, mas também adequar-se à proposta de manejo de resistência⁶⁷.

Em relação aos bioinseticidas à base de Bt, diferentes produtos foram desenvolvidos para o controle de insetos na agricultura e também contra espécies de mosquitos. A maior parte é baseada na produção de esporos de diferentes estirpes de *B. thuringiensis* que, de uma maneira geral, expressam proteínas Cry, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) HD1, que expressa proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, ou HD73, que produz proteína Cry1Ac; *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137, que produz diferentes toxinas Cry, como Cry1Aa, Cry1B, Cry1Ca e Cry1Da; *B. thuringiensis* var. *san diego* e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, que produzem a toxina Cry3Aa, e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, contendo as toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1Aa^{8,68}.

Os primeiros relatos de amplas variações na suscetibilidade ao Dipel® foram observados em *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae) coletada em grãos armazenados, embora os grãos não tivessem histórico de tratamento com formulações à base de Bt⁶⁹. Uma pesquisa maior sobre grãos armazenados⁷⁰, tanto em material tratado com Bt como em material não tratado, confirmou a alta variabilidade natural encontrada no estudo anterior⁶⁹ e estimulou vários experimentos de seleção em laboratório. Um nível de resistência ao Dipel® cem vezes maior foi desenvolvido com sucesso quando populações de *P. interpunctella* foram submetidas a apenas 15 gerações de seleção em laboratório⁷⁰. Outros estudos demonstraram níveis e taxas variáveis de desenvolvimento de resistência (15 a 250 vezes maior), com cinco diferentes colônias de *P. interpunctella* que foram selecionadas por 40 gerações⁷¹.

A primeira incidência de resistência em laboratório de uma praga agrícola de campo foi observada para *H. virescens*⁷². Após apenas três gerações de seleção em Cry1Ab, a suscetibilidade foi reduzida em três vezes. A seleção continuou usando ou uma proteína Bt isolada (Cry1Ab) ou Dipel®, que empurrou o nível de resistência para mais de 70 vezes para Cry1Ab purificada e 57 vezes para Dipel® após 22 gerações de pressão de seleção.

Durante algum tempo, muitos concluíram que a resistência a biopesticidas à base de Bt era improvável, pois não havia relatos de resistência de campo documentados, apesar dos mais de 20 anos de uso da tecnologia. Experimentos de seleção em laboratório mostravam o potencial para resistência; contudo, representavam circunstâncias que raramente imitam condições de campo, especialmente devido ao pequeno número de insetos nas colônias selecionadas com diversidade genética limitada. O complexo modo de ação de Bt, envolvendo múltiplas toxinas e múltiplos sítios de ligação, foi considerado a base para a ausência de desenvolvimento de resistência⁷³.

A primeira evidência de resistência ao Bt em campo aberto ocorreu nas Filipinas com *P. xylostella*⁷⁴, seguido de casos no Havaí⁷⁵, Tailândia⁷⁶, Filipinas⁷⁷, Coreia⁷⁸ e Japão⁷⁹. Desde então, muitos outros casos de desenvolvimento de resistência em campo com essa espécie de inseto têm sido reportados⁴⁹. Muitas dessas populações surgiram em localidades tropicais, onde *P. xylostella* pode produzir mais de 25 gerações ao ano e onde os campos são intensamente pulverizados com inseticidas à base de Bt^{77,80}.

O estudo de populações de insetos em condições de laboratório tem mostrado que, fornecida uma variabilidade inicial suficiente, qualquer espécie de inseto pode ser selecionada para resistência a produtos formulados com base em Bt e/ou em suas proteínas Cry⁴⁹. A seleção em laboratório tem mostrado que as principais pragas-alvo das culturas Bt atuais

podem desenvolver resistência às proteínas Cry. Populações resistentes de laboratório têm sido obtidas para *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae), *H. virescens*, *P. gossypiella*^{55,56} e *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae)⁵⁷.

Existem duas principais diferenças entre pulverizações com Bt e culturas Bt com relação à pressão de seleção imposta sobre populações de insetos. Uma é que a persistência dos esporos e cristais de Bt é relativamente curta quando estes são pulverizados, dependendo das condições ambientais. Os cristais inseticidas podem ser lavados durante períodos de chuva, e suas proteínas são gradualmente inativadas pela radiação UV e/ou degradadas por micro-organismos. Em contraste, as atuais culturas Bt expressam genes dos bacilos constitutivamente, e suas proteínas produzidas são estáveis dentro do ambiente da célula vegetal⁶⁵. A segunda maior diferença é que pulverizações com Bt quase invariavelmente contêm uma combinação de proteínas inseticidas, já que isolados de Bt normalmente carregam vários genes de proteínas inseticidas⁸¹. Além disso, a presença do esporo tem mostrado uma ação sinérgica contra algumas pragas⁸². Em contraste, as culturas Bt comercializadas até pouco tempo atrás expressavam apenas um gene de proteína inseticida. No entanto, essa segunda diferença tende a mudar com o avanço da tecnologia de culturas Bt, uma vez que plantas transgênicas que expressam mais de um gene com distintos modos de ação vêm sendo comercializadas contra o mesmo grupo de insetos-praga⁸³. Comparativamente com a primeira geração de plantas Bt, as plantas expressando genes piramidados são mais efetivas para o controle de algumas pragas^{84,85}.

As diferenças supracitadas entre pulverizações Bt e culturas Bt podem resultar numa velocidade diferenciada na seleção de populações de insetos resistentes entre essas duas abordagens de controle de insetos. A combinação de mais de uma proteína inseticida em produtos Bt diminui a chance de se encontrar um indivíduo resistente. De fato, existem exemplos de populações de insetos que vêm se tornando resistentes a uma única proteína Cry, mas que continuam mantendo a suscetibilidade a formulações Bt contendo a mesma proteína Cry juntamente com outras proteínas desse grupo^{77,82}. Entretanto, tem sido mostrado que insetos podem se tornar resistentes simultaneamente a várias proteínas Cry se uma alteração de sua interação com os sítios de ligação compartilhados ocorrer⁸⁶. Na prática, não é raro encontrar isto em produtos Bt, visto que as proteínas Cry mais tóxicas a um inseto-praga específico compartilham o mesmo sítio de ligação⁸⁷. Nesse caso, o produto Bt vai agir quase que como se uma única proteína inseticida fosse produzida, e o desenvolvimento de resistência se tornará muito mais provável.

A primeira diferença citada, que reside na persistência das proteínas inseticidas, relaciona-se com a chance de o inseto ingerir uma dose subletal da proteína. Assumindo que a dose de proteína Cry aplicada em uma planta ou produzida por uma planta GM é suficiente para matar os insetos que se alimentam dela, a chance de um inseto escapar da morte é muito mais alta em um campo pulverizado do que em um campo GM. Uma razão é que a cultura Bt supostamente expressa a proteína inseticida em um nível consistente (alto) durante todo o período de crescimento. Entretanto, não somente a persistência do produto pulverizado é responsável pelos escapes no campo pulverizado com Bt, mas também o fato de que, na prática, é quase impossível cobrir uniformemente toda a superfície da planta. O efeito disso na evolução da resistência é duplo: primeiro, os insetos que não ingerirem a dose letal do biopesticida terão o mesmo efeito como no refúgio em campos Bt em termos de diluição dos alelos de resistência. Em segundo, insetos carregando genes de resistência que não conferem total resistência a altas doses de biopesticida podem ser expostos a doses subletais e sobreviver. Mantendo-se este quadro em médio-longo prazo, poderá surgir uma combinação de diferentes genes de resistência, levando a altos níveis de resistência. Enquanto o primeiro fenômeno pode resultar em um desenvolvimento mais lento de resistência a pulverizações com Bt do que a culturas Bt, o segundo fenômeno aparentemente tem efeito contrário⁶⁵.

Devido a essas preocupações, culturas Bt foram introduzidas com específicos planos de manejo de resistência, que faltam para produtos formulados à base de Bt. Esses programas de monitoramento de resistência devem ter como objetivo maximizar a eficiência da tecnologia através do tempo. A implementação de tais programas tem como foco monitorar pragas-alvo em que a perda da sensibilidade da praga afetaria diretamente o uso da tecnologia. Independentemente do método utilizado, ele precisa ser eficiente e estar inserido em um plano de ação realista, consistindo em um componente essencial para a detecção e caracterização da resistência⁸⁸.

No caso de desenvolvimento de resistência a culturas Bt, mesmo com esses cuidados de manejo, deve haver apenas um impacto limitado aos produtos formulados à base de Bt, uma vez que os mercados estão quase que completamente segregados. Os maiores mercados para produtos formulados de Bt estão em frutas, hortaliças e florestas, sendo que nenhum destes atualmente possui espécies cultivadas que expressem proteínas Bt. Alternativamente, milho, algodão, batata e arroz, que têm sido transformados com genes Bt, são raramente pulverizados com formulações Bt. Atualmente, o milho-doce Bt tem crescido nos Estados Unidos, embora isso represente

menos que 5% do total do mercado de milho-doce e menos que 1% do total do mercado do milho⁶⁵.

O processo de evolução da resistência é um caso típico de seleção darwiniana, no qual a constante pressão de seleção, exercida pelas estratégias de controle de pragas, eleva a frequência de detecção de indivíduos pré-adaptados já existentes dentro da população. Essas populações muitas vezes possuem variação genética natural que interfere na resposta a uma toxina. Alelos que conferem suscetibilidade e outros que conferem resistência estão presentes naturalmente dentro dessa variabilidade genética. Consequentemente, diferenças na sobrevivência ou na fecundidade de indivíduos dentro dessas populações são passíveis de serem observadas quando estas são expostas a diferentes estratégias de controle, podendo levar à seleção de indivíduos resistentes a tais práticas. Contudo, uma espécie pode apresentar baixa suscetibilidade a uma determinada toxina, sem que isso seja um processo de evolução de resistência. A simples detecção de alelos de resistência sem a demonstração da elevação na sua frequência também não corresponde a um processo evolucionário. Na prática, para populações de campo, a resistência ocorre quando o número de insetos resistentes é suficiente para causar danos econômicos semelhantes àqueles causados por indivíduos suscetíveis em uma variedade da cultura não resistente ao inseto¹³⁶.

Um elemento-chave para estimar a taxa de evolução da resistência numa população exposta a um inseticida é a frequência inicial de alelos de resistência. Entretanto, estimar isso não é simples, uma vez que muitos alelos de resistência são recessivos e a frequência deles é muito baixa antes que a resistência se torne evidente⁸⁹. A lei da genética das populações nos diz que, em um cenário ideal, a frequência de alelos de resistência recessivos (q) é a raiz quadrada da frequência de indivíduos resistentes (q^2)¹³⁷.

(Equação 21.1)

$$q = \sqrt{f(aa)}$$

O problema prático para a aplicação dessa lei na estimativa da frequência inicial dos alelos de resistência é que, em populações não previamente expostas a inseticidas, a frequência de insetos resistentes homozigotos pode ser tão baixa que na prática podemos estar inaptos a detectá-los⁸⁹.

Uma estimativa indireta da frequência desses alelos pode ser obtida por meio de experimentos de seleção em laboratório que conseguiram constatar a resistência. Nesses casos, pelo menos uma cópia do alelo de resistência tem que estar presente no início da seleção (a não ser que este apareça por mutação durante a seleção, e isto é considerado um evento muito improvável).

Experimentos de seleção a partir de coletas de 100 até 700 indivíduos do campo mostraram que a frequência dos alelos de resistência nas populações originais possa ser estimada em aproximadamente^{90,91} 5×10^{-3} . Entretanto, temos de ser cautelosos com as estimativas obtidas com essa abordagem, já que os valores podem ser superestimados se não considerarmos que outras tentativas de seleção nessas mesmas populações levaram a resultados mal sucedidos⁹², ou se as populações foram previamente expostas ao Bt inadvertidamente, como infestação natural ou devido a tratamentos com bioinseticidas⁹³. Essa abordagem direta tem como principal desvantagem o fato de ser aplicável somente a alelos recessivos, cujo locus para colônia de laboratório é homozigótica para resistência, já que alelos recessivos em qualquer outro locus escapam da detecção.

Uma abordagem diferente baseia-se em testar para resistência a progênie F2 de insetos coletados em campo. Já que muitos alelos recessivos são carregados em heterozigose, a progênie F2 permite a detecção do alelo recessivo em homozigose. O método de busca em F2 é de longe mais sensível (mais de dez vezes) do que um ensaio de dose discriminante para detecção de traços recessivos e não requer obtenção prévia de uma colônia resistente de laboratório⁹⁴.

Recentemente, devido ao conhecimento acumulado nas bases genéticas da resistência, buscas baseadas em DNA têm sido aplicadas para estimar a frequência dos alelos de resistência em populações de campo. Em contraste com as estimativas prévias, menores frequências têm sido obtidas usando a abordagem molecular. A razão para isso pode ser que a abordagem molecular detecta somente a frequência do gene testado, enquanto as estimativas por outros métodos podem ser influenciadas por outros genes de resistência^{95,96}.

Em contraste aos alelos recessivos, alelos não recessivos (dominantes ou parcialmente dominantes) podem ser detectados tanto em indivíduos homozigotos quanto heterozigotos. Um teste de desafio de toxina é suficiente para determinar se a progênie de fêmeas coletadas no campo carrega alelos de resistência ou não⁹⁷.

Insetos podem, em princípio, se tornar resistentes a proteínas Cry devido a mutações em genes que codificam proteínas envolvidas em quaisquer dos diferentes passos no modo de ação. Vários mecanismos têm sido observados em linhagens de insetos selecionados em laboratório, assim como ligações alteradas aos receptores do intestino médio, ativação de protoxina alterada, degradação da toxina, reparo ou troca mais eficiente das células do intestino médio danificadas, sequestro de esterase e elevado *status* de imunidade^{8,98}.

A resistência de insetos a toxinas inseticidas é uma questão pré-adaptativa, e a avaliação do seu potencial de risco de evolução requer que se conheça o padrão de herança dessa característica. De acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (lei que fundamenta o estudo da genética de populações) indivíduos heterozigotos são os principais carregadores dos alelos de resistência, principalmente nas etapas iniciais do processo. Nos casos em que o padrão de herança desse caráter é recessivo, a mortalidade dos heterozigotos é semelhante à dos homozigotos suscetíveis, e como resultado temos uma baixa sobrevivência desses indivíduos. No entanto, a recessividade do caráter resistência não deve ser generalizada, havendo alguns casos nos quais ela pode ser dominante. Nesses casos, sua detecção só seria conhecida após a evolução da resistência em condições de campo ou por seleção de indivíduos resistentes em laboratório. Garantir a mortalidade dos indivíduos heterozigotos através da expressão de toxinas inseticidas em altas doses nas plantas GM é uma das estratégias mais amplamente utilizadas para retardar a evolução da resistência. Nesse caso, o padrão recessivo para herança da resistência é fundamental para o sucesso dessa estratégia^{99,136,137}.

Conhecer o inseto-praga alvo de controle da planta GM é essencial para elaboração de estratégias de manejo eficientes. Alguns aspectos bioecológicos devem ser observados, como taxa efetiva de movimento das larvas entre as plantas da cultura, capacidade de dispersão dos adultos, hábito alimentar e frequência de utilização de hospedeiros alternativos como fonte de abrigo ou alimento⁹⁹. Também é importante observar a variedade de sistemas na qual a cultura GM está inserida e suas características particulares, pois estas influenciarão o comportamento populacional da praga. No Brasil, o plantio de milho e algodão em áreas vizinhas ou de forma sucessiva é um bom exemplo. Essas duas culturas apresentam pragas em comum, o que afetará a forma de exploração de ambas as atividades⁹⁹. Nos Estados Unidos, essas características influem diretamente na recomendação das áreas de refúgio^{100,101}.

A eficiência de controle de indivíduos heterozigotos, e consequentemente a probabilidade de seleção de indivíduos resistentes, é diretamente influenciada pela dose e o número de toxinas utilizadas no controle desses insetos. Utilizar a estratégia de altas doses de inseticidas sintéticos para o manejo de resistência de insetos se mostrou inviável por problemas práticos, como elevação do custo de produção e o amplo espectro de ação, que acaba por afetar também insetos benéficos, além de colocar em risco a saúde do trabalhador e do consumidor. Plantas transgênicas expressando altas doses de toxinas Bt possibilitaram a adoção dessa estratégia nos programas de manejo da resistência, considerando-se como alta dose a expressão da toxina na planta 25

vezes acima da necessária para controlar 99% da população suscetível da praga. Além disso, o acompanhamento da atividade inseticida dos eventos transgênicos ao longo do seu desenvolvimento e da expressão das toxinas nos diferentes tecidos das plantas são pontos fundamentais que influenciarão a eficiência de controle; dessa forma, seu conhecimento é importante para a elaboração correta de um plano de manejo de resistência. Durante o desenvolvimento das plantas podem ocorrer variações na expressão de suas toxinas, acarretando uma maior probabilidade de aumento na pressão de seleção para indivíduos resistentes quando a concentração das toxinas oscilar a níveis inferiores ao necessário para matar os indivíduos heterozigotos, ponto crítico para o sucesso dessa estratégia⁹⁹.

Programas de manejo da resistência são elaborados com o objetivo de se evitar, retardar, ou mesmo reverter o quadro de evolução da resistência. Para isso, algumas estratégias podem ser adotadas, como o uso de plantas expressando altas doses das toxinas simultaneamente ao plantio de áreas de refúgio, o uso de plantas com mais de um gene Bt, a exploração simultânea de diferentes toxinas Bt em vários híbridos ou variedades comerciais de plantas GM e o uso de plantas com expressão das toxinas direcionadas para determinados tecidos ou estágios fenológicos. Também existe a possibilidade de uso da estratégia de baixa dose, mesmo que pouco difundida⁶⁵.

Como já mencionamos, a principal estratégia adotada é a expressão de toxinas em altas doses, o que só foi possível com o avanço da engenharia genética, que possibilitou manipulações específicas na sequência de DNA dos genes de Bt inseridos nas plantas. Conciliando a estratégia de altas doses com o plantio de áreas de refúgio, indivíduos que eventualmente possam sobreviver na cultura GM encontrarão uma quantidade maior de indivíduos provenientes das áreas de refúgio. Dos possíveis cruzamentos, qualquer alelo de resistência tende a se dissipar. No entanto, para que essa premissa seja atendida, as áreas de refúgio devem ser suficientemente atrativas para oviposição da praga, admitindo-se que o número de insetos homozigotos suscetíveis deva ultrapassar a soma do número de heterozigotos e homozigotos resistentes em uma proporção maior ou igual¹⁰² a 500:1. Além disso, outros pontos importantes são: a emergência dos adultos da área de cultura GM e da área de refúgio deve estar sincronizada para garantir o acasalamento aleatório entre indivíduos da população suscetível com indivíduos resistentes e o refúgio deve ter localização, distância e disposição de forma a garantir o contato entre as duas populações. A localização das áreas de refúgio deve ser determinada pela capacidade de dispersão e locomoção da praga^{50,102,103,104,105}.

Conforme dito anteriormente, outra estratégia mais recentemente utilizada é a adoção de plantas piramidadas expressando dois ou mais genes com ação inseticida. O modo de ação dessas toxinas deve ser bioquimicamente distinto e com baixo potencial de resistência cruzada^{83,85}. Diversos modelos matemáticos aplicados demonstraram que a expressão de duas ou mais toxinas garante a maior durabilidade da tecnologia, em relação do emprego de plantas contendo apenas uma toxina^{106,107}.

Programas de manejo de resistências devem ser proativos, e o monitoramento da suscetibilidade das populações de insetos-praga alvos de controle é muito importante. Primeiramente, deve-se estabelecer a resposta natural de populações geograficamente distintas dos insetos-praga às toxinas Bt, estabelecendo linhas básicas de suscetibilidade antes que a cultura GM seja liberada comercialmente no campo. Em seguida, o acompanhamento sistemático da suscetibilidade das populações nessas regiões deve ser feito, preferencialmente através de concentrações diagnósticas ou discriminatórias, sendo o método de bioensaios por concentrações diagnósticas o recomendado pela Environmental Protection Agency (EPA) para monitoramento nos Estados Unidos. Acredita-se que esse método possua eficiência de detecção da resistência quando a frequência dos alelos atingir 1%, ponto no qual já são observadas falhas de controle da tecnologia em campo¹⁰⁸.

A detecção de alelos extremamente raros em populações de insetos-praga pode ser realizada também pela técnica do *F2 Screen*, que a partir de um número muito menor de indivíduos coletados no campo permite a detecção de alterações na suscetibilidade⁹⁴.

As coletas para acompanhamento da suscetibilidade devem considerar também os diferentes regimes de seleção aos quais os insetos-praga são expostos, como as diversas culturas e sistemas de produção. Áreas que exercem maior pressão de seleção devem ser criteriosamente amostradas.

De fato, o uso dessa tecnologia influenciou diretamente o tamanho e modo de implementação das áreas de refúgio norte-americanas. O uso de mistura de sementes (*refuge in the bag*), já em estudo no Brasil, foi aprovado recentemente nos Estados Unidos, para a região conhecida como Cinturão do Milho (*Corn Belt*), onde não se planta algodão em sucessão quando é utilizado o milho Bt “piramidado” em mistura com milho convencional^{67,101}. Antes implantada em faixas, blocos ou bordaduras, a estratégia de refúgio em mistura de sementes é considerada uma alternativa para a falta de adoção da recomendação de refúgio por parte dos agricultores. Um levantamento realizado no início dos anos 2000 indicou que 25% dos produtores de híbridos de milho Bt norte-americanos não seguiam as especificações

corretas de refúgio¹⁰⁹. O uso correto de refúgio estruturado caiu de 85% em 2003 para 61% no ano de 2009¹¹⁰. Os principais fatores negativos relacionados ao refúgio foram o trabalho adicional com o plantio e menor retorno econômico para os agricultores em relação ao cultivo transgênico^{111,112}. A situação ainda se agrava em países onde o cumprimento das especificações de refúgio e/ou infraestrutura estão sendo discutidas⁹². Nesse caso, com o uso da estratégia de mistura das sementes, a adoção das especificações de refúgio não é mais responsabilidade dos produtores, e sim das empresas que comercializam as sementes¹¹³.

21.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso de plantas transgênicas expressando genes Bt mostrou ser uma importante ferramenta para o controle de insetos-praga nas principais culturas de interesse agrícola, além de reduzir substancialmente a dependência de defensivos químicos e exercer um impacto positivo no ambiente. Apesar de existir casos de resistência a algumas toxinas comercializadas atualmente, apenas um número limitado de toxinas foram introduzidas nessa tecnologia⁸. Novas cepas de *Bt* são regularmente reportadas na literatura^{86,114,115}, principalmente através do uso de métodos proteômicos, que permitem a triagem de novas toxinas em grande escala⁷. Em adição, a próxima geração de plantas Bt irá expressar dois ou mais genes na mesma planta, controlando insetos de diferentes ordens e/ou atuando em mais de um modo de ação da mesma espécie. Isso também reduzirá a possibilidade de desenvolvimento de resistência da praga-alvo. Um melhor entendimento do modo de ação das toxinas e também como os insetos respondem às diferentes proteínas permitirá o avanço no desenvolvimento de culturas Bt e bioinseticidas mais eficientes⁸.

Juntamente com o avanço do uso de genes Bt para o controle de pragas, outras abordagens vêm sendo pesquisadas, e, recentemente, a utilização de RNA de interferência (RNAi) é considerada uma alternativa promissora aos métodos atuais de controle. O uso dessa tecnologia não só se provou eficiente com insetos das ordens Diptera¹¹⁷, Lepidoptera^{118,119}, Coleoptera^{120,121} e Hymenoptera¹²², mas também com insetos sugadores^{120,123}, contra os quais ainda não existem toxinas Bt eficazes¹²⁷. A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, iniciado através da introdução de RNA fita dupla (dsRNA) em uma célula^{124,125}, ou seja, é uma regulação negativa ou *knockdown* de um gene específico envolvendo a

degradação de um RNA mensageiro-alvo (mRNA)^{126,127}. Esse dsRNA pode reduzir a transcrição de um gene-alvo quando injetado num organismo ou introduzido em células de cultura¹²⁶. Inicialmente detectada em plantas^{127,128}, essa tecnologia vem sendo continuamente estudada em invertebrados, em particular *Caenorhabditis elegans*^{129,130,131} e células S2 de *Drosophila* sp.^{132,133}, através da injeção do dsRNA na célula ou pela ingestão do dsRNA inserido na dieta. O uso do dsRNA no controle de insetos, através da absorção pela alimentação ou aplicação tópica, atua no silenciamento de genes essenciais para sua sobrevivência, induzindo o cessamento da alimentação e morbidade do inseto¹²⁰. Seu efeito *knockdown* tornou-se uma importante ferramenta para estudar a função de genes em diversos organismos. Adicionalmente, essa técnica tem levado ao desenvolvimento de novos métodos de controle de insetos-praga em importantes culturas agrônômicas, como resultado da engenharia genética de plantas que possam expressar o dsRNA¹²⁷.

Apesar das inúmeras pesquisas de sucesso do uso de RNAi em diferentes organismos e no controle de insetos, vários aspectos, como via de contaminação, riscos para organismos não alvo, disponibilidade/expressão na planta, concentração a ser aplicada e até mesmo o desenvolvimento de insetos resistentes à tecnologia ainda limitam sua praticidade em campo. Sua eficácia em longo prazo só poderá ser estabelecida após extensa experimentação no campo¹²⁷.

Dentre as possíveis abordagens, a mais promissora é a utilização de plantas transgênicas expressando dsRNA com efeito *knockdown* em genes essenciais para a sobrevivência do inseto. No entanto, seu potencial promissor ainda depende da identificação de genes-alvo que possam matar ou inibir a resistência do inseto a alguma toxina. Plantas com genes piramidados consistem em outra opção de controle de insetos, uma vez que o silenciamento de um único gene pode não resultar na morte do inseto¹²⁷.

Ainda que possua especificidade a uma espécie ou grupo de espécies relacionadas, seu uso como pesticida dependerá dos efeitos exercidos contra organismos não alvos, sendo possivelmente esta uma das maiores limitações dessa técnica. Diferentes métodos de aplicação podem ser considerados, como a pulverização de um ou mais tipos de dsRNAs condicionados a determinada etapa do ciclo da planta ou tecido que se encontre vulnerável a uma determinada praga, ou insetos que aparecem em sucessão¹²⁷. Tais formulações de dsRNA cruas já mostraram eficiência no silenciamento de genes de vírus de plantas, além de apresentarem estabilidade residual por diversos dias¹³⁴.

Até o momento, o uso de plantas Bt é um dos principais e mais eficientes métodos de controle alternativo ao controle químico. No entanto, em função dos casos de resistência a toxinas Bt já relatados na literatura, faz-se necessária a busca contínua por alternativas sustentáveis de controle de pragas.

21.6 CONCLUSÃO

Devido ao constante avanço na tecnologia aplicada ao controle de pragas, os insetos vivem sob contínua pressão de seleção pelos métodos empregados. Por muitos anos, o controle químico representou a principal ferramenta no controle de pragas na agricultura. No entanto, seu uso contínuo e indiscriminado ocasionou diversos efeitos prejudiciais ao produtor, consumidor e ambiente. Diante disso, a busca por alternativas sustentáveis em relação ao controle químico vem sendo estimulada, e o uso de Bt mostra-se eficiente e viável no manejo de insetos-praga.

Após várias décadas do início de sua utilização na agricultura, seja através de biopesticidas ou cultivos transgênicos, os resultados são extremamente positivos e vantajosos, principalmente em termos de segurança, eficácia e benefícios ambientais. Esses benefícios trouxeram grandes avanços econômicos tanto para os países em desenvolvimento quanto para os mais industrializados.

O grande potencial de aplicação da tecnologia de plantas Bt no Brasil traz consigo de maneira essencial a necessidade de elaboração e execução de programas de manejo de resistência efetivos para a manutenção da garantia da vida útil dessa tecnologia no país. É responsabilidade das empresas detentoras dessa tecnologia promover a conscientização de seus clientes sobre a importância das áreas de refúgio e do monitoramento da resistência. Por fim, há ainda de se pensar em planos para contenção, caso sejam detectados aumentos nos níveis de resistência em determinadas populações de insetos.

REFERÊNCIAS

1. Devine GJ, Furlong MJ. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*. 2007;24:281-306.
2. Milner RJ. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1994;49:9-13.
3. Garczynski SF, Siegel JP. Bacteria. In: Lacey LA, Kaya HK, editors. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests*, 2nd edition, Dordrecht: Kluwer; 2007. p. 175-97.
4. Mattes O. Parasitäre Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. (Zugleich ein Beitrag zur Zytologie der Bakterien). *Gesellschaft für Befruchtungs Naturwissenschaften Sitzber Marburg*. 1927;62:381-417.
5. Husz B. Experiments during 1931 on the use of *Bacillus thuringiensis* Berliner in controlling the corn borer. *International Corn Borer Investigation Reports*. 1931;4:22-3.
6. Beegle CC, Yamamoto T. History of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) research and development. *Canadian Entomologist*. 1992;124:584-616.
7. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*. 2011;9:283-300.
8. Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;41:423-31.
9. Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996;93:5389-94.
10. Hernández-Martínez P, Hernández-Rodríguez CS, Van Rie J, Escriche B, Ferré J. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2013;113:78-81.
11. Takhore Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2006;2:194-208.
12. James C. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Briefs 51. Ithaca: GM Crops; 2015.
13. Barfoot P, Brookes G. Key environmental impacts of global genetically modified (GM) crop use 1996-2012. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*. 2013;5:2
14. Gill SS, Cowles EA, Pietrantoni PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 1992;37:615-36.

15. Lee MK, You TH, Gould FL, Dean DH. Identification of Residues in Domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin That Affect Binding and Toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65:4513-20.
16. Bravo A, Gill SS, Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007;49:423-35.
17. Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [Internet] [Cited 2016 April 20]. Available from: <http://www.btnomenclature.info/>.
18. Shi Y, Xu W, Yuan M, Tang M, Chen J, Pang Y. Expression of vip1/vip2 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. *Appl Microbiol*. 2004;97:757-65.
19. Sampurna S, Maiti MK. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *J Microbiol Biotechnol*. 2011;21:937-46.
20. Milne R, Liu Y, Gauthier D, Van Frankenhuyzen K. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008;99:166-72.
21. Farkas J, Sebesta K, Horska K, Samek Z, Dolejs L, Sorm F. Structure of thuringiensin, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Collect Czech Chem Commun*. 1976;42:909-29.
22. Copping LG, Menn JJ. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management*. 2000;56:651-76.
23. Knowles B. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. *Advances in Insect Physiology*. 1994;24:275-308.
24. Aronson AI, Beckman W, Dunn P. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. *Microbiological Reviews*. 1986;50:1-24.
25. Von Tersch MA, Slatin SL, Kulesza CA, English LH. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:3711-7.
26. Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *Journal of Bacteriology*. 2006;188:3391-401.
27. Lee MK, Young BA, Dean DH. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys Res Commun*. 1995;216:306-12.
28. Knowles BH, Dow JAT. The crystal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*. 1993;15:469-76.

29. Lee MK, Curtiss A, Alcantara EA, Dean DH. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:583-6.
30. Ameen AO, Fuxa JR, Richter AR. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa Zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomological Science*. 1998;33:129-35.
31. Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*. 2003;37:409-33.
32. Bravo A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin family proteins and their functional domains. *J Bacteriol*. 1997;179:2793-801.
33. Zhang X, Candas M, Griko NB, Rose-Young L, Bulla Jr. LA. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*. 2005;12:1407-16.
34. Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005;88:91-142.
35. Soberón M, López-Díaz JA, Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*. 2013;41:87-93.
36. Thomas WE, Ellar DJ. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal-endotoxin. *FEBS Lett*. 1983;154:362-8.
37. Knowles BH, White PJ, Nicholls CN, Ellar DJ. A broad-spectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*. *Proc R Soc Ser B*. 1992;248:1-7.
38. Promdonkoy B, Ellar DJ. Investigation of the pore forming mechanism of cytolytic-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J*. 2003;374:255-9.
39. Butko P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:2415-22.
40. Sayyed AH, Crickmore N, Wright DJ. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:5859-61.
41. Warren GW, Koziel MG, Mullins MA, inventors. Novel pesticidal proteins and strains. World Intellectual Property Organization 1996. Patent WO 96/10083.
42. Yu X, Zheng A, Zhu J, Wang S, Wang L, Deng Q, Li S, Liu H, Li P. Characterization of Vegetative Insecticidal Protein vip genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. *Curr Microbiol*. 2011;62:752-757.
43. Lee MK, Miles P, Chen JS. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339:1043-7.

44. Sena JA, Hernández-Rodríguez CS, Ferré J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:2236-7.
45. Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl Environ Microbiol.* 2003;269:4648-57.
46. Selvapandiyan A, Arora N, Rajagopal R, Jalali SK, Ven Katesan T, Singh SP, Bhatnagar RK. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001;67:5855-8.
47. Rang C, Gil P, Neisner N, Van Rie J, Frutos R. Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005;71:6276-81.
48. Raybould A, Quemada H. Bt crops and food security in developing countries: realised benefits, sustainable use and lowering barriers to adoption. *Food Sec.* 2010;2:247-59.
49. Ferré J, Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol.* 2002;47:501-33.
50. Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carrière Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *J Econ Entomol.* 2009;102:211-25.
51. Van Frankenhuyzen K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol.* 2009;101:1-16.
52. Bespalhok FJC, Guerra EP, Oliveira R. Introdução ao Melhoramento de Plantas [Internet]. [Cited 2012 Mar 15]. Available from: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%201.pdf>.
53. Murphy AF, Ginzl MD, Krupke CH. Evaluating western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) emergence and root damage in a seed mix refuge. *Journal of Economic Entomology.* 2010;103:147-57.
54. Liu BTB, Tabashnik BE, Dennehy TJ, Patin AL, Bartlett AC. Development time and resistance to Bt crops. *Nature.* 1999;400:519.
55. Liu BTB, Tabashnik BE, Meyer SK, Carrière BT, Bartlett AC. Genetics of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Journal of Economic Entomology.* 2001;94:248-52.
56. Tabashnik BE, Liu BTB, Dennehy TJ, Sims MA, Sisterson MS, Biggs RBT, Carrière BT. Inheritance of resistance to Bt toxin Cry1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology.* 2002;95:1018-26.
57. Whalon ME, Miller DL, Hollingworth RM, Grafius EJ, Miller JR. Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology.* 1993;86:226-33.
58. Matten SR, Head GP, Quemada. HD. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs. In: Romeis J, Shelton AM,

- Kennedy GGS, editors. Integration of Insect- Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs. New York: Springer; 2008. p. 27-39.
59. Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J Econ Entomol.* 2010;103:1031-8.
60. Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology.* 2002;47:845-81.
61. Van Rensburg JBJ. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *S African J Plant Soil.* 2007;24:147-51.
62. Dhurua S, Gujar GT. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest Manag. Sci.* 2011;67:898-903.
63. Gassmann AJ, Petzold-Maxwell J, Keweshan RS, Dunbar M. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. *PLoS ONE.* 2011;6:22-9.
64. Flanders KL. Corn. 2014 [Cited 2014 May 20]. In: Alabama pest management book [Internet]. Alabama A&M and Auburn Universities. Available from: <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-0500-A/ANR-0500-A.pdf>.
65. Ferré J, Van Rie J, MacIntosh SC. Insecticidal Genetically Modified Crops and Insect Resistance Management (IRM). In: Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs. Dordrecht: Springer; 2008. p. 41-85.
66. James C. Global status of commercialized biotech. ISAAA Briefs 41. Ithaca: GM Crops; 2009.
67. Monsanto. IRM grower guide: Insect resistance management for U.S. corn and cotton-growing áreas [Internet]. 2012. Available from: <http://www.monsanto.com/products/Pages/insectresistance- management.aspx>.
68. Soberón M, Gill SS, Bravo A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:1337-49.
69. Kinsinger RA, McGaughey WH. Susceptibility of populations of Indian meal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology.* 1979;72: 346-9.
70. McGaughey WH. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science.* 1985;229:193-5.
71. McGaughey WH, Beeman RW. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology.* 1988;81:28-33.
72. Stone TB, Sims SR, Marrone PG: Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 1989;53:228-34.

73. Whalon ME, McGaughey WH. *Bacillus thuringiensis*: Use and resistance management. In: Ishaaya I, Degheele D, editors. *Insecticides with Novel Modes of Action*. New York: Springer; 1998. p. 106-37.
74. Kirsch K, Schmutterer H. Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis* (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) in the Philippines. *Journal of Applied Entomology*. 1988;105:249-55.
75. Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson M. Field Development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*. 1990;83:1671-6.
76. Zoebelein G. Twenty-three year surveillance of development of insecticide resistance in diamondback moth from Thailand (*Plutella xylostella* L., Lepidoptera, Plutellidae). *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit*. 1990;55:313-22.
77. Ferré J, et al. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1991;88:5119-23.
78. Song SS. Resistance of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.: Yponomeutidae: Lepidoptera) against *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Korean Journal of Applied Entomology*. 1991;30:291-3.
79. Tanaka H, Kimura Y. Resistance to Bt formulation in diamondback moth, *Plutella xylostella* L., on watercress. *Japanese Journal of Economic Entomology and Zoology*. 1991;35:253-5.
80. Tang JD, Shelton AM, Van Rie J, De Roeck S, Moar WJ, Roush RT, Peferoen M. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:564-9.
81. Iriarte J, Bel BT, Ferrandis M, Andrew R, Murillo J, Ferré J, Caballero P. Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Systematic and Applied Microbiology*. 1998;21:97-106.
82. Moar BTJ, Pusztai-Carey M, Van Faassen BT, Frutos R, Rang C, Luo K, Adang MJ. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61:2086-92.
83. Ghimire MN, Huang F, Leonard RB, Head GP, Yang Y. Susceptibility of Cry1Absusceptible and—resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. *Crop Protect*. 2011;30:74-81.
84. Burkness EC, Dively G, Patton T, Morey AC, Hutchison WD. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions. *GM Crop*. 2010;1:1-7.
85. Niu Y, Meagher Jr. RL, Yang F, Huang F. Susceptibility of Field Populations of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to Purified

Cry1f Protein and Corn Leaf Tissue Containing Single and Pyramided Bt Genes. Florida Entomologist. 2013;96:701-13.

86. Wang G, Zhang J, Song F, Gu A, Uwais A, Shao T, Huang D. Recombinant *Bacillus thuringiensis* strain shows high insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Leptinotarsa decemlineata* without affecting non-target species in the field. J Appl Microbiol. 2008;105:1536-43.

87. Ibargutxi MA, Estela A, Ferré J, Caballero P. Use of *Bacillus thuringiensis* toxins for control of the cotton pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Applied and Environmental Microbiology. 2006;72:437-42.

88. Siegfried BD, Spencer T, Crespo AL, Storer NP, Head GP, Owens ED, Guyer D. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer. Am Entomol. 2007;53:208-14.

89. Tabashnik BE, Patin AL, Dennehy TJ, Liu YB, Carrière Y, Sims MA, Antilla L. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2000;97:12980-4.

90. Gould F, Martínez-Ramírez A, Anderson A, Ferré J, Silva FJ, Moar WJ. Broadspectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1992;89:7986-90.

91. Gould F, Anderson A, Reynolds A, Bumgarner L, Moar W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Journal of Economic Entomology. 1995;88:1545-59.

92. Gould F. Deploying pesticidal engineered crops in developing countries. In: Persley GJ, editor. Biotechnology and Integrated Pest Management. Wallingford: CABI; 1996, p. 264-293.

93. Estada U, Ferré J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. Applied and Environmental Microbiology. 1994;60:3840-6.

94. Andow DA, Alstad DN. The F2 screen for rare resistance alleles. Journal of Economic Entomology. 1998;91:572-8.

95. Tabashnik BE, Fabrick JA, Henderson S, Biggs RW, Yafuso CM, Nyboer ME, Manhardt NM, Coughlin LA, Sollome J, Carrière Y, Dennehy TJ, Morin S. DNA screening reveals pink bollworm resistance to Bt cotton remains rare after a decade of exposure. J Econ Entomol. 2006;99:1525-30.

96. Gahan LJ, Gould F, López Jr. JD, Micinski S, Heckel DG. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. J Econ Entomol. 2007;100:187-94.

97. Burd AD, Gould F, Bradley JR, Van Duyn JW, Moar WJ. Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. *J Econ Entomol.* 2003;96:137-42.
98. Tabashnik BE, Malvar T, Liu YB, Finson N, Borthakur D, Shin BS, Parks SH, Masson L, Maagd RA, Bosh D. Cross resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domains II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62:2839-44.
99. Martinelli O, Omoto C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 2005;34:67-77.
100. Pioneer. Insect Resistance Management for Bt Corn Borer and Corn Rootworm Products [Internet]. [Cited 2012 Feb 3]. Available from: https://www.pioneer.com/CMRoot/pioneer/us/products/stewardship/irm_brochure_2015.pdf.
101. Wangila DS, Leonard BR, Ghimire MN, Bai Y, Zhang L, Yang Y, Emfinger KD, Head GP, Yang F, Niu Y, Huang F. Occurrence and larval movement of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in seed mixes of non-Bt and Bt pyramid corn. *Pest Manag. Sci.* 2013;69:1163-1172.
102. EPA (Environmental Protection Agency). FIFRA scientific advisory panel, subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant pesticides and resistance management [Internet]. [Cited 1998 Apr 28]. Available from: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/1998/february/finalfeb.pdf>
103. EPA (Environmental Protection Agency). Introduction to biotechnology regulation for pesticides: insect resistance management in Bt crops [Internet]. [Cited 2008 May 2]. Available from: <http://www.epa.gov/oppbpp1/biopesticides/regtools/biotech-reg-prod.html>
104. Tabashnik BE, Carrière Y, Dennehy TJ, Morin S, Sisterson MS, Roush RT, Shelton AM, Zhao JZ. Insect Resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J Econ Entomol.* 2003;96:1031-8.
105. López C, Hernández-Escareño G, Eizaguirre M, Albajes R. Antixenosis and larval and adult dispersal in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, in relation to Bt maize. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 2013;149:256-64.
106. Roush RT: Bt-transgenic crops: Just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? *Pesticide Science.* 1997;51:328-34.
107. Zhao JZ, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology.* 2003;21:1493-7.
108. USEPA/USDA (United States Environmental Protection Agency/ United States States Department of Agriculture). EPA/USDA Position Paper on Insect Resistance Management for Bt Crops 1999, Docket Number: D-16122A (posted 1999 Aug 26).

109. Jaffe G. Complacency on the farm: significant noncompliance with the EPAs refuge requirements threatens the future effectiveness of genetically engineered pest-protected corn [Internet]. [Cited 2014 May 1]. Washington: Center for Science in the Public Interest. Available from: <http://cspinet.org/new/pdf/complacencyonthefarm.pdf>.
110. Dunlop G. Bt Corn IRM Compliance in Canada [Internet]. [Cited 2009 May 15]. Available from: http://www.cornpest.ca/tasks/sites/default/assets/File/2009_BT_Corn_IRM_Compliance_Study_CCPC_Report_Final.pdf.
111. Mendelsohn M. *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production (vector ZMIR13L) in event MON 863 corn & *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production in corn (006430,006484) fact sheet [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. 2006. Available from: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006484.htm.
112. Hurley TM, Kangrock I, Ostlie K. Estimating the benefits of Bt corn and cost of insect resistance management ex ante. *J Agr Resour Econ*. 2006;31:355-75.
113. Qureshi JA, Buschman L, Throne JE, Ramaswamy SB. Dispersal of adult *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) and its implications for corn borer resistance management in *Bacillus thuringiensis* maize. *Ann Entomol Soc Am*. 2006;99:279-91.
114. Sun Y, Park HW. Proteomic analysis of the crystal and spore mixture from *Bacillus thuringiensis* strains to search for novel mosquitocidal proteins. NCBI database. [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/292398077>.
115. Zhang L, Huang E, Lin J, Gelbic I, Zhang Q, Guan Y, Huang T, Guan X. A novel mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 isolated from the phylloplane of *Magnolia denudata*. *Microbiol Res*. 2010;165:133-41.
117. Walshe DP, Lehan SM, Lehan MJ, Haines LR. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology*. 2009;18:11-9.
118. Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*. 2006;15:383-91.
119. Bautista MAM, Miyata T, Miura K, Tanaka T. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;39:38-46.
120. Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*. 2007;25:1322-6.

121. Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*. 2007;25:1307-13.
122. Nunes FMF, Simões ZLP. A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;39:157-60.
123. Hughes CL, Kaufman TC. RNAi analysis of deformed, proboscipedia and sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development*. 2000;127:368-9.
124. Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002;418:244-51.
125. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*. 2004;431:356-63.
126. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391:806-11.
127. Katoch R, Sethi A, Thakur N, Murdock LL. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;171:847-73.
128. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*. 1990;2:279-89.
129. Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExX box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*. 2002;109:861-71.
130. Tijsterman M, May RC, Simmer F, Okihara KL, Plasterk RH. Genes required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*. 2004;14:111-6.
131. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006;441:537-41.
132. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404:293-6.
133. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409:363-6.
134. Tenllado F, Llave C, Diaz-Ruiz JR. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*. 2004;102:85-96.
135. Vanchon V, Laprade R, Schwartz JL. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2012;111:1-12.
136. Bernardi O, Albernaz KC, Valicente FH, Omoto C. Resistência de Insetos-Praga às Plantas Geneticamente Modificadas. In: Borém A, Almeida GD, editors. *Plantas*

geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais. Visconde do Rio Branco: Suprema; 2011. p. 181-207.

137. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908;78:49-50.

138. Tabashnik BE, Zhang M, Fabrick JA, Wu Y, Gao M, Huang F, Wei J, Zhang J, Yelich A, Unnithan GC, Bravo A, Soberón M, Carrière Y, Li X. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Scientific Reports*. 2015; 5: 15107.

22

CAPÍTULO

SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS, HORMÔNIOS E O CONTROLE DA DOPAGEM NO ESPORTE

Cinthia de Carvalho Mantovani
Marcelo Filonzi dos Santos
Mauricio Yonamine

22.1 INTRODUÇÃO

“*Doping*” pode ser definido como o uso de métodos e substâncias com o objetivo específico de aumentar o desempenho em atividades físicas e/ou mentais, apesar dos efeitos adversos para a saúde¹. A etimologia vem do idioma dos *boers*, uma população localizada ao sul da África. “Dop” é uma infusão estimulante utilizada em festas religiosas dessa população sul-africana².

A busca constante do homem de se superar, obtendo resultados positivos para a força e potência, está presente em todos os momentos da história da humanidade. Na Bíblia, segundo Csáky, ocorreu um caso de dopagem: Eva ofereceu o fruto proibido a Adão, afirmando que, se ele o comesse, ficaria tão forte e poderoso quanto Deus³.

Há relatos bibliográficos nos quais, o imperador chinês Shen-Nunge, no ano de 2737 a.C., descreve o efeito estimulante da planta “Ma Huang”, utilizada pelos atletas chineses. De fato, essa folha contém altas concentrações de efedrina, um estimulante do sistema nervoso central que teria a capacidade de aumentar a força de trabalho⁴. Sabe-se também da utilização, por atletas gregos, de dietas especiais e estimulantes, cujo objetivo era deixá-los mais fortes e aptos à prática esportiva.

No início do século XIX, era frequente a ingestão pelos ciclistas e outros atletas de alto desempenho de álcool, cafeína, cocaína e estricnina. Nos Jogos Olímpicos de 1904, Thomas Hicks obteve o primeiro lugar na maratona com a ajuda de ovo cru, injeções de estricnina e doses de conhaque durante a prova. As restrições ao uso de drogas nos esportes tornaram-se evidentes durante a década de 1920⁵.

Nos Jogos Olímpicos de Los Angeles de 1932, houve rumores de que as vitórias da equipe de natação japonesa estavam associadas ao uso de substâncias^{6,7}. Há relatos do uso de estricnina nos Jogos de Melbourne, em 1956⁸.

Os esteroides anabolizantes ainda não eram amplamente utilizados durante as competições olímpicas de 1960, limitando-se aos atletas da antiga União Soviética e levantadores de peso dos Estados Unidos. Porém, a informação de que essas substâncias seriam capazes de aumentar a massa muscular propiciou sua utilização sem qualquer controle, principalmente nos esportes nos quais o uso da força é o diferencial, como levantamento de peso, arremesso, lançamento, saltos e corridas. Na olimpíada seguinte, em 1964, era visível a nítida diferença entre prováveis competidores usuários de anabolizantes e aqueles que não os utilizaram^{9,10,11,12}.

Ainda na década de 1960, utilizou-se o *doping* sanguíneo. Um pouco antes das competições de ciclismo, esqui e provas de velocidade, atletas europeus receberam a transfusão de glóbulos vermelhos, hemocomponentes responsáveis pelo transporte de oxigênio¹³.

22.2 CRIAÇÃO DE REGULAMENTOS DO CONTROLE DA DOPAGEM

Com o objetivo de manter o ideal olímpico e preservar o espírito dos Jogos, em 1967 foi criado o Comitê Olímpico Internacional (COI) ou, em inglês, International Olympic Committee (IOC). Esse comitê, formado por especialistas em medicina do esporte e toxicologia, criou a Lista de

Substâncias Proibidas, cuja atualização é anual (ver adiante). A primeira relação de substâncias e métodos proibidos é mostrada na Tabela 22.1. Os primeiros testes para dopagem em eventos olímpicos ocorreram nos Jogos Olímpicos de Inverno de Grenoble, em 1968, e nos Jogos de Verão, na Cidade do México¹⁴.

Tabela 22.1 Primeira listagem de classes de substâncias e métodos proibidos elaborada pelo Comitê Olímpico Internacional

| ANO | CLASSES DE SUBSTÂNCIAS E MÉTODOS PROIBIDOS |
|------|--|
| 1967 | Estimulantes do sistema nervoso central |
| | Estimulantes psicomotores |
| | Aminas simpatomiméticas |
| | Analgésicos narcóticos |

Em 1998, em Lausanne, na Suíça, ocorreu o I Simpósio Mundial *Antidoping*, cuja finalidade era resolver as dúvidas geradas pelo Tour de France, em 1997. No simpósio, surge a pergunta: “Quem deve realizar o exame *antidoping*? O Estado ou o movimento olímpico”? O simpósio é finalizado com a criação da Agência Mundial Antidopagem (AMA), com sede em Lausanne e composta por representantes dos cinco continentes, com base na igual representação do movimento olímpico e autoridades públicas¹⁴. A AMA (em inglês, World Anti-Doping Agency – WADA), criada em 1999, é o órgão máximo mundial no controle *antidoping*.

O primeiro exame *antidoping* realizado no Brasil ocorreu antes da criação do COI: no dia 23 de abril de 1964, em um jogo de futebol entre as equipes do Grêmio e Internacional². Esse evento tem apenas valor histórico.

No Brasil, oficialmente, o controle oficial de dopagem foi implementado em 1972, pela Deliberação nº 5/72 do Conselho Nacional de Desportos (CND). Em 2003, foi instituída a Comissão de Combate ao *Doping*, que propôs ao Conselho Nacional de Esportes (CNE), através das diretrizes registradas na Resolução nº 2 (de 2004), do Ministério do Esporte, as normas básicas de controle de dopagem nas partidas, provas ou equivalentes do desporto¹⁵.

Em 2008, através do Decreto nº 6.653, é promulgada a convenção internacional contra o *doping* nos esportes, celebrada em Paris, no dia 19 de outubro de 2005¹⁶. Através do Decreto nº 7.630, de 2011, foi instituída a Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem (ABCD), na estrutura

regimental do Ministério do Esporte. O Brasil, país-sede dos Jogos Olímpicos e Paraolímpicos de 2016, cujas competições ocorreram na cidade do Rio de Janeiro, atendeu à exigência da WADA, com a criação de um órgão específico de controle de dopagem no país¹⁷.

22.3 CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES DE DOPAGEM

O controle antidopagem objetiva preservar os valores reais das competições, ou seja, o real espírito do esporte. Este pode ser definido como a celebração do espírito, corpo e mente humanos, e tem agregados os seguintes valores:

- Ética, jogo justo e honestidade.
- Saúde.
- Excelência em desempenho.
- Educação e caráter.
- Alegria e diversão.
- Trabalho em equipe.
- Empenho e dedicação.
- Respeito por regras e leis.
- Respeito próprio e com os outros participantes.
- Coragem.
- Comunidade e solidariedade.

De fato, o *doping* é fundamentalmente contrário ao espírito do esporte¹⁸.

Anualmente, no mês de janeiro, a WADA atualiza as listas de substâncias e métodos proibidos*. Outras federações esportivas utilizam essa listagem para a elaboração de regulamentações.

Existem, de acordo com a classificação da WADA, diferentes agentes de dopagem e métodos proibidos cujo controle pode ocorrer dentro e/ou fora das competições esportivas¹⁹. A listagem completa é relativamente grande e não será apresentada na íntegra neste capítulo. A informação completa está disponível na *homepage* da WADA. Para fins didáticos, as seguintes substâncias e métodos são apresentados, de acordo com os critérios da entidade:

* Disponíveis em <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/>.

Substâncias (S) e métodos (M) proibidos dentro e fora do período de competições

- S0. Substâncias não aprovadas: qualquer substância farmacológica não aprovada por agências reguladoras governamentais.
- S1. Agentes anabólicos
 - 1) Esteroides anabólicos androgênicos
 - 2) Outros agentes anabólicos
- S2. Hormônios peptídicos, fatores de crescimento e substâncias correlatas
 - 1) Agentes estimulantes da eritropoiese
 - 2) Gonadotrofina coriônica (*chorionic gonadotropin* – CG) e hormônio luteinizante (*luteinizing hormone* – LH) em indivíduos do sexo masculino
 - 3) Corticotrofinas e seus fatores de liberação
 - 4) Hormônio do crescimento (*growth hormone* – GH), fator de crescimento do tipo insulina (*insulin-like growth factor-1* – IGF-1), fatores de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* – FGFs), fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor* – HGF), fatores de crescimento mecânico (*mechanogrowth factor* – MGFs), fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* – PDGF) e fator de crescimento vascular-endotelial (*vascular endothelial growth factor* – VEGF)
- S3. Beta-2 Agonistas
- S4. Moduladores hormonais e metabólicos
 - 1) Inibidores da aromatase
 - 2) Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (*selective estrogen receptor modulators* – SERMs)
 - 3) Outras substâncias antiestrogênicas
 - 4) Agentes modificadores da(s) função(ões) da miostatina
 - 5) Moduladores metabólicos
 - a) Insulina
 - b) Agonistas do receptor ativado de proliferação peroxissomal δ (*peroxisome proliferator-activated receptor delta* – PPAR δ) e agonistas do eixo proteína quinase PPAR δ -AMP-ativada (*AMP-activated protein kinase* – AMPK)
- S5. Diuréticos e outros agentes mascarantes
- M1. Manipulação de sangue e componentes sanguíneos

- 1) A administração ou reintrodução de qualquer quantidade e de qualquer origem autóloga, alogênica (homóloga) ou heteróloga de sangue ou células vermelhas no sistema circulatório
- 2) Transportadores de oxigênio artificiais
- 3) Qualquer forma de manipulação intravascular de sangue ou componentes sanguíneos por meios químicos ou físicos
 - M2. Manipulação química e física
- 1) Adulteração, ou tentativa de adulteração, a fim de alterar a integridade e validade das amostras coletadas no controle de dopagem
- 2) Infusão intravenosa e/ou injeção de volume superior a 50 mL em um período de 6 horas, exceto para atletas com justificativa médica
 - M3. *Doping* genético
- 1) Transferência de ácidos nucleicos ou fragmentos de ácidos nucleicos
- 2) Uso de células normais ou geneticamente modificadas

Substâncias (S) e métodos (M) proibidos durante competições

- S6. Estimulantes
- 1) Estimulantes não especificados
 - 2) Estimulantes especificados
- S7. Narcóticos
 - S8. Canabinoides
 - S9. Glicocorticoides

Substâncias (P) proibidas em esportes específicos

- P1. Álcool
- P2. Betabloqueadores

22.4 CONTROLE DA DOPAGEM

Como já dito, o controle da dopagem iniciou-se, efetivamente, no ano de 1968. As competições monitoradas foram os Jogos Olímpicos de Inverno, na cidade de Grenoble, na França, e nos Jogos de Verão, na Cidade do México¹⁵. Nessas oportunidades, foram analisados somente alguns estimulantes e narcóticos, pois a tecnologia analítica existente era limitada²⁰.

Nas Olimpíadas de Munique, em 1972, foi utilizada pela primeira a tecnologia de cromatografia gasosa (CG, ou, em inglês, *gas chromatography* – GC) acoplada ao detector de nitrogênio-fósforo (DNP, ou, em inglês, *nitrogen-phosphorus detector* – NPD) para as triagens das amostras²¹, buscando-se estimulantes e opioides²². Um sistema de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (EM, ou em inglês, *mass spectrometry* – MS) foi utilizado para confirmações²³.

No início da década de 1970, não havia métodos analíticos padronizados disponíveis para a análise de esteroides anabolizantes por GC-MS. Além disso, não eram possíveis, ainda, testes de rotina em larga escala. Essa situação impulsionou a pesquisa e o desenvolvimento de testes de triagem com a tecnologia de imunoensaios. Não era um teste específico para o uso de esteroides anabolizantes, pois a urina humana pode conter tais substâncias de origem endógena²³.

Durante as Olimpíadas de Montreal, ocorrida em 1976, 15% das amostras foram analisadas em busca de esteroides anabolizantes, utilizando a técnica de imunoensaios²².

Um fato curioso ocorreu após as Olimpíadas de Moscou, em 1980: após as competições, o dr. Manfred Donike desenvolveu um novo método para análises de testosterona exógena. A técnica foi aplicada retroativamente em todas as amostras de urina. Os resultados apontaram 20% de positividade em todos os atletas, incluindo homens e mulheres. Nesse grupo, houve dezesseis medalhistas de ouro²⁴.

Nos Jogos Olímpicos de Los Angeles, em 1984, já se conhecia o hormônio do crescimento, assim como seu uso para melhora no desempenho esportivo²⁴ (e, após três olimpíadas, em 1996, alguns atletas referiram-se aos Jogos Olímpicos de Atlanta como os “jogos do hormônio do crescimento”, devido à grande utilização entre os competidores²⁵).

Ainda em 1984, ao término das atividades, 24 ciclistas masculinos da equipe norte-americana também admitiram *doping* sanguíneo antes das competições^{26,27}. Nesse ano, como resultado da parceria entre a empresa Hewlett-Packard, (fabricante de instrumentos científicos e computadores) e a Universidade da Califórnia, houve a possibilidade de análise de 100% das amostras para esteroides anabolizantes. A razão testosterona/epitesterona, utilizada como critério para detectar o uso proibido de testosterona, foi determinada empregando a tecnologia de GC-MS²².

O destaque negativo nos Jogos de Seul, em 1988, foi a constatação de uso de um esteroide anabolizante pelo velocista Ben Johnson. Não foi o único caso positivo: dois levantadores de peso, medalhistas de ouro, apresentaram

diuréticos na urina²⁴. Uma investigação do jornal *The New York Times* concluiu que pelo menos metade dos atletas utilizaram esteroides anabolizantes durante essa olimpíada na tentativa de melhorar o desempenho²⁸.

Na década seguinte, verificou-se o uso de esteroides anabolizantes, hormônio de crescimento e eritropoietina recombinante não somente no halterofilismo e em provas de velocidade, mas também no hóquei, natação, ciclismo, voleibol, handebol, pentatlon e futebol^{24,29}.

Em 2000, nos Jogos de Sidnei, novamente o uso de substâncias proibidas foi o destaque das competições. Houve dezenas de artigos publicados a respeito desse problema no esporte³⁰⁻³⁸.

Para o controle da dopagem na América Latina, há três países credenciados pela Associação Mundial *Antidoping*, localizados, respectivamente, na América Central, América do Sul e América do Norte: Cuba, Colômbia e México³⁹.

No Brasil, através da Federação Paulista de Futebol, no ano de 1974, introduziu-se o controle da dopagem, com exames realizados no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LAT/FCF/USP)¹⁵.

Durante os anos de 1993 a 2004, no mundo, observa-se que a porcentagem de resultados analíticos adversos, ou seja, positivos, variou de 1% a 2%. Esteroides anabolizantes, estimulantes, corticosteroides e *cannabis* foram as classes de substâncias com maiores incidências, conforme mostrado na Tabela 22.2¹⁵.

Tabela 22.2 Quantificação dos agentes de dopagem, classificados e analisados entre 1994 e 2004

| CLASSES | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 |
|----------------------------------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Agentes anabólicos | 891 | 986 | 1.131 | 967 | 856 | 973 | 946 | 914 | 966 | 872 | 1.191 |
| Hormônios | 3 | 9 | 4 | 5 | 12 | 20 | 12 | 26 | 41 | 79 | 78 |
| Agonista beta-2* | — | — | — | 393 | 479 | 536 | 489 | 398 | 382 | 297 | 381 |
| Diuréticos e agentes mascarantes | 78 | 73 | 60 | 101 | 92 | 142 | 96 | 126 | 159 | 161 | 157 |
| Estimulantes | 347 | 310 | 281 | 356 | 412 | 532 | 453 | 352 | 392 | 516 | 382 |
| Narcóticos | 42 | 34 | 37 | 47 | 18 | 9 | 14 | 29 | 13 | 26 | 15 |
| Canabinoides | 75 | 224 | 154 | 164 | 233 | 312 | 295 | 298 | 347 | 378 | 518 |
| Corticosteroides | 2 | — | — | — | — | — | 89 | 46 | 249 | 286 | 548 |
| Betabloqueadores | 15 | 14 | 6 | 11 | 12 | 24 | 21 | 20 | 15 | 30 | 25 |

* Antes de 1996, possuíam a classificação de “agentes anabólicos”.

Os cientistas mundiais dos esportes estão em constante luta contra o tempo, buscando novas tecnologias para detectar substâncias proibidas nas competições. Para todos os profissionais envolvidos nos exames de dopagem, o maior desafio é a enorme heterogeneidade bioquímica e metabólica das substâncias utilizadas para o *doping*⁴⁰.

22.5 SUBSTÂNCIAS PROIBIDAS

Nas seções subsequentes, serão abordadas as substâncias proibidas pela WADA no ano de 2014. Por razões didáticas, estas serão divididas em “substâncias exógenas” e “substâncias endógenas e similares sintéticos”. De maneira geral, as substâncias como os beta-2 agonistas, moduladores hormonais e metabólitos, diuréticos, estimulantes, narcóticos, canabinoides e betabloqueadores, constantes do primeiro grupo, são produzidas através de síntese química. Ademais, o controle da dopagem no esporte para estas é realizado através de técnicas cromatográficas. Dessa forma, tendo em vista o escopo do presente livro, a abordagem de tais substâncias será sucinta.

Maior enfoque será dado ao tópico “substâncias endógenas e similares sintéticas” já que este se destina a explanação acerca de hormônios e peptídeos que apresentam correlação com técnicas de biotecnologia em sua produção e/ou detecção no controle da dopagem no esporte.

22.5.1 Substâncias exógenas

Os beta-2 agonistas são potentes broncodilatadores utilizados há muito tempo na terapêutica para controle da asma. Além dessa aplicação, também são empregados na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e em outras doenças respiratórias, podendo ser utilizados isoladamente ou em combinação com corticosteroides inalatórios⁴¹⁻⁴³.

Na prática esportiva, esses fármacos são usados devido ao potencial efeito anabolizante e estimulante. Na parte anaeróbia, ocorre aumento da massa muscular em consequência da inibição da degradação proteica^{44,45}. Na parte aeróbia, estudos sugerem aumento do rendimento físico após a inalação de salbutamol, salmeterol, formoterol e terbutalina. O clenbuterol parece estimular diretamente as células lipídicas e acelerar a quebra de triglicerídeos para formar ácidos graxos livres. O efeito termogênico do clenbuterol pode ser aumentado com o uso concomitante de hormônios da tireoide e/

ou hormônio de crescimento⁴⁶. Os principais efeitos colaterais são: tremores musculares, vasodilatação pulmonar, vertigens, sudorese, câibras musculares, parada cardíaca²².

Já os diuréticos são agentes terapêuticos utilizados para aumentar a taxa de excreção urinária e eliminação de sódio, a fim de ajustar o volume e composição dos fluidos corpóreos ou eliminar excesso de líquidos dos tecidos. Eles são utilizados na terapia clínica para o tratamento de diversas doenças e síndromes, tais como hipertensão, cirrose hepática, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, doenças renais e pulmonares e, de modo geral, redução dos efeitos adversos da retenção de sais e/ou água⁴⁷. Os diuréticos foram inicialmente proibidos nos esportes (durante e fora das competições) em 1988. Duas características dos diuréticos motivaram sua inclusão na listagem de substâncias proibidas. Devido às suas propriedades farmacológicas, os diuréticos promovem rápida perda de água, resultando em diminuição da massa corpórea. Dessa forma, são utilizados por atletas de modalidades esportivas em que o peso determina a categorização do competidor. Além disso, os diuréticos podem ser usados para mascarar a administração de outras substâncias proibidas através do aumento do volume urinário, e consequente redução na concentração dos marcadores da dopagem nesta amostra. Os efeitos colaterais mais relatados são desidratação, problemas renais, dores de cabeça, náuseas e câibras. Em particular, o fármaco espirolactona pode causar ginecomastia, impotência sexual e menstruação irregular⁴⁸.

Os estimulantes, por sua vez, são utilizados para melhora do desempenho esportivo pois, devido ao aumento nas neurotransmissões do sistema nervoso central, acarretam maior estimulação mental, melhora na concentração e fortalecimento da resistência física⁴⁹. As principais substâncias dessa classe, cafeína, anfetamina, efedrina e cocaína, atuam sobre o sistema monoaminérgico, afetando os níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina. Dentre os efeitos colaterais correlacionados ao uso dessas substâncias, pode-se citar aumento da pressão arterial, dor de cabeça, arritmia, ansiedade e tremores²².

Os narcóticos representam uma importante classe farmacológica de analgésicos, com ação no sistema nervoso central. São utilizados pelos atletas para alívio da dor, de modo que, sob efeito dessas substâncias, mesmo com lesões musculares os competidores tornam-se capazes de realizar esforços físicos⁴⁹. Os principais efeitos adversos são constipação e sonolência⁵⁰.

O uso de canabinoides (substâncias presentes na maconha, haxixe e *skank*) e a melhora no desempenho esportivo é considerado tema controverso. O consumo de canabinoides antes da competição pode resultar em tomada de decisão inadequada pelo atleta, acarretando sérias lesões ou

acidentes envolvendo outros competidores, principalmente em eventos nos quais os movimentos devem ser realizados em curtos espaços de tempo⁵¹. Uma possível utilização como agente de dopagem pode estar correlacionada à ação nos sistemas de recompensa e prazer do cérebro, resultando numa diminuição da ansiedade e estresse dos atletas⁵². Os efeitos adversos incluem o desenvolvimento de esquizofrenia e outras doenças mentais, respiratórias crônicas e câncer⁵³.

Os betabloqueadores são proibidos em alguns esportes específicos, os quais necessitam de precisão para serem praticados. Esses fármacos são responsáveis por diminuir a frequência cardíaca e tremores dos atletas, podendo representar melhora no desempenho esportivo em modalidades de tiro, arco e flecha e sinuca⁵⁰. Os principais efeitos adversos associados ao uso de betabloqueadores são fadiga, redução da temperatura de extremidades corpóreas, hipoglicemia e broncoespasmos em atletas asmáticos.

O consumo de bebidas alcoólicas é prática antiga na humanidade e, devido à sua venda lícita, o etanol é a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo. Na dopagem no esporte, atletas poderiam fazer uso do álcool com o objetivo de aumentar a autoconfiança e diminuir a tensão e o estresse. Entretanto, estudos mostram que o consumo de álcool entre os atletas está correlacionado com efeitos negativos sobre a saúde e o desempenho esportivo. Em baixas doses, o álcool apresenta efeitos sedativos sobre o atleta; em altas doses, observa-se comprometimento da habilidade psicomotora, como tempo de reação, equilíbrio e coordenação⁵⁴. Dessa forma, esta é uma substância proibida em diversos esportes.

De maneira geral, a detecção das substâncias supracitadas, ou de seus biomarcadores, em amostras biológicas dos atletas é suficiente para que seja configurado um caso de dopagem no esporte. Para algumas substâncias específicas, são tolerados níveis máximos da substância nas amostras biológicas e, em outros casos, como citado, o fármaco pode ser utilizado pelo atleta desde que haja prévia autorização, baseada em indicação médica. Resumidamente, as análises conduzidas para o controle da dopagem de tais substâncias consistem, inicialmente, em testes imunológicos de triagem. Caso algum resultado positivo seja identificado, este é então confirmado através de técnicas de cromatografia líquida ou gasosa acopladas a detectores de chamas, nitrogênio-fósforo, espectrometria de massas, dentre outros.

22.5.2 Substâncias endógenas e similares sintéticos

22.5.2.1 Esteroides anabólicos androgênicos

Por estimular a síntese de proteínas, esses hormônios contribuem para o desenvolvimento dos músculos esqueléticos, com aumento de força (5% a 20%) e peso corporal (2 Kg a 5 Kg), devido ao ganho de massa corporal magra. Parece não melhorar o rendimento aeróbio⁵⁵.

Os efeitos adversos do uso de esteroides são: hirsutismo, acne, atrofia testicular, alopecia, ginecomastia em homens, virilização de mulheres, hipertrofia clitoriana e problemas hepáticos⁵⁶.

22.5.2.2 Glicocorticoides

Glicocorticoides são hormônios fisiológicos produzidos na região do córtex renal. Na clínica médica, seu potencial terapêutico é incontestável em várias doenças crônicas inflamatórias. Na área esportiva, sua utilização por via oral, retal, intravenosa e intramuscular é proibida, sendo permitida somente em preparações dermatológicas (cremes e pomadas, por exemplo) e em condições terapêuticas, nas quais é necessário informar seu uso para “autorização de uso terapêutico”. Devido às suas propriedades farmacológicas proporcionarem alívio da dor e da inflamação de tecidos lesionados, seu uso, quando não autorizado, é classificado como *doping*⁵⁷. Os principais efeitos colaterais são fragilidade dos tendões, rompimentos musculares, retenção hídrica, fadiga crônica, infecções locais e generalizadas e problemas cardiovasculares.

22.5.2.3 Hormônio do crescimento humano e fator de crescimento semelhante à insulina I

O hormônio de crescimento humano (*human growth hormone* – hGH) é um hormônio peptídico produzido e secretado pela hipófise⁵⁸. O hGH é responsável pelo estímulo de inúmeros processos celulares, apresentando efeitos sobre o metabolismo proteico, lipídico, mineral e de carboidratos⁵⁹.

O hGH foi obtido pela primeira vez em 1956 através da extração e purificação de glândulas pituitárias cadavéricas, sendo empregado no tratamento

de pacientes com hipopituitarismo. Durante muitos anos, o hGH cadavérico foi a única alternativa terapêutica, até que, em 1985, tornou-se prática obsoleta devido à sua correlação com o desenvolvimento da doença priônica de Creutzfeldt-Jakob⁶⁰. Em 1987, a indústria farmacêutica passou a comercializar a primeira versão do hormônio do crescimento humano recombinante (*recombinant human growth hormone* – rhGH).

O início da utilização do hGH como agente de dopagem é desconhecido; entretanto, publicações científicas indicam que na década de 1980 atletas já utilizavam tal hormônio, visando obter aumento no desempenho esportivo. Inicialmente empregado por praticantes de esportes que requerem força, atualmente sua utilização estende-se também a outras modalidades, como de resistência. Devido às dificuldades no controle da dopagem no esporte, acredita-se que este seja um dos principais agentes utilizados pelos atletas⁶¹.

Quando utilizado no tratamento da deficiência de hGH, observa-se a normalização da composição corporal dos indivíduos com aumento da massa muscular e redução do componente lipídico, assim como melhora da capacidade aeróbica e aumento do consumo máximo de oxigênio⁵⁶. De maneira geral, o hGH é administrado a atletas por longos períodos e em doses até dez vezes maiores do que a terapêutica⁵⁸. Além disso, tendo em vista que o hGH estimula a síntese proteica por mecanismo distinto daquele dos esteroides anabolizantes, essas substâncias são utilizadas em combinação pelos atletas, a fim de obter efeito aditivo sobre o desenvolvimento muscular⁶¹.

Apesar de sua utilização como agente da dopagem no esporte, o aumento do desempenho esportivo é questionável^{58,62}. Além disso, tendo em vista as doses suprafisiológicas empregadas pelos atletas, diversos efeitos deletérios são correlacionados com tal prática. Acromegalia, retenção de fluidos, inchaço nos tornozelos, hipertensão, dor de cabeça, diabetes e cardiomiopatia caracterizada por anormalidades na estrutura e função do músculo cardíaco são alguns dos possíveis efeitos adversos da dopagem no esporte com hGH^{56,63}. Ademais, embora atualmente a produção de hGH pela indústria farmacêutica seja realizada através de tecnologia de DNA recombinante, ainda é possível encontrar no mercado negro suprimentos de hGH cadavérico, o que pode ocasionar o desenvolvimento da doença priônica de Creutzfeldt-Jacob⁶³.

A detecção da dopagem no esporte por rhGH é, atualmente, um dos maiores desafios para as agências e laboratórios antidopagem. Diferentemente de outras substâncias usadas na dopagem, o rhGH não pode ser distinguido do hGH endógeno, já que ambos apresentam sequência de aminoácidos idêntica. Dessa forma, é necessária a detecção de níveis acima do

fisiológico para que a dopagem com rhGH seja comprovada. Entretanto, esta é uma abordagem que também apresenta inúmeras limitações⁶³. O hGH apresenta meia-vida plasmática consideravelmente reduzida, de aproximadamente 15 minutos, e de 8 a 16 horas após administração intramuscular e 11 a 20 horas após administração intracutânea do rhGH os níveis do hormônio voltam aos valores basais. Além disso, os níveis circulantes do hGH são consideravelmente variáveis devido ao padrão pulsátil de secreção e à influência de diversos fatores como idade, exercícios, sono, estresse e estado nutricional⁶². Consequentemente, a detecção de elevada concentração sérica pode ser meramente reflexo da secreção endógena do hormônio⁶³.

Tendo em vista as limitações anteriormente citadas, duas abordagens têm sido preconizadas como adequadas para a identificação da dopagem no esporte por rhGH. A primeira delas consiste na detecção das diferentes isoformas moleculares do hGH. O hGH endógeno ocorre no organismo em múltiplas isoformas, todas derivadas de um único gene presente na hipófise. A isoforma majoritária é a de 22 KDA, seguida pela isoforma de 20 KDA e, em menor proporção, pelos fragmentos de 17 KDA⁵⁶. Sabe-se que, como resposta à administração de rhGH, ocorre aumento de diversos fatores que, através de *feedback* negativo, inibem a secreção endógena de hGH. Diferentemente do hGH, o rhGH consiste somente na isoforma de 22 KDA. Dessa forma, quando da administração de rhGH, a relação entre as isoformas é alterada, sendo observado aumento na proporção de 22 KDA frente às outras isoformas. Essa alteração na proporção é atualmente a base teórica do método de detecção da dopagem no esporte por rhGH⁶².

A proporção entre a isoforma de 22 KDA e as demais isoformas do hGH é determinada através de dois imunoenaios que empregam anticorpos monoclonais. Um dos ensaios é responsável pela detecção da isoforma de 22 KDA e outro pela detecção das demais isoformas do hGH. A elevação da razão entre os ensaios é utilizada para detectar os casos de dopagem esportiva, sendo que os *cutoffs* empregados pela WADA foram derivados de análises de amostras de atletas quando em condições reais de controle da dopagem^{64,65}. Ademais, a WADA preconiza que qualquer resultado analítico adverso deva ser confirmado por teste diferente daquele empregado na análise inicial. Dessa forma, para detecção da dopagem por rhGH são utilizados dois kits diferentes de imunoenensaio, que, apesar de apresentarem princípio comum, reconhecem diferentes epítomos do hormônio⁶³.

Os imunoenaios empregados atualmente pelos laboratórios acreditados pela WADA consistem em tubo revestido com anticorpos de captura e anticorpos de detecção diretamente rotulados com éster de acridina, que

apresenta sinal luminescente quando excitado por energia específica. Esses ensaios apresentam prolongada estabilidade e elevada sensibilidade e especificidade^{58,65}. Entretanto, o método de detecção através das isoformas apresenta limitações. A principal desvantagem desse método é a sua estreita janela de detecção, já que o rhGH é depurado rapidamente do organismo, e 48 horas após a administração de rhGH a secreção do hormônio endógeno volta ao normal. Assim, essa técnica apresenta maior aplicabilidade nos testes fora de competição⁶³. Vale ainda lembrar que a administração de hGH cadavérico, disponível comercialmente no mercado negro, não pode ser detectada por essa metodologia por apresentar a mesma composição de isoformas que o hGH endógeno⁶⁵.

Essa abordagem foi aplicada pela WADA inicialmente no controle da dopagem dos jogos olímpicos de Atenas (2004) e Turim (2006), e nenhum resultado positivo foi verificado⁶².

A segunda abordagem empregada para detecção da dopagem no esporte com hGH baseia-se no princípio de que a sua ação anabólica e metabólica acarreta produção de proteínas que podem ser utilizadas como marcadores da administração desse hormônio⁶³. Os estudos epidemiológicos *GH-2000* e *GH-2004*⁵⁸, patrocinados pelo COI, União Europeia, WADA e U. S. Anti-Doping Agency (USADA), foram conduzidos com o objetivo de identificar e avaliar a aplicabilidade de diferentes marcadores. Dentre os 25 potenciais marcadores da utilização de rhGH, dois deles, o fator de crescimento relacionado à insulina (IGF-I) e o peptídeo pró-colágeno tipo III (P-III-NP), foram selecionados para o controle da dopagem no esporte. Estes apresentam vantagens frente à metodologia anteriormente descrita, já que a variação diária nos níveis de ambos os marcadores e a influência de fatores como gênero, etnia, prática de exercícios e lesões esportivas é reduzida⁵⁸. Além disso, o aumento nos níveis desses marcadores é dependente da dose de rhGH administrada, e as chances de resultado falso positivo são reduzidas, pois o IGF-I e o P-III-NP são produzidos em tecidos diferentes⁶³. A janela de detecção dessa abordagem é de uma a duas semanas, mais longa do que aquela da detecção das isoformas⁶⁵.

O IGF-I é um hormônio peptídico com 70 aminoácidos, massa de 7,6 KDa e uma estrutura bastante homóloga à da insulina e da proinsulina⁶⁶. Ele é secretado por vários tecidos, mas o fígado é a principal fonte do IGF-I circulante⁶⁷.

Muitos tecidos apresentam atividade anabólica estimulada pela ação do IGF-I, resultando na síntese de DNA e várias proteínas⁶⁸. Ele exerce seus efeitos após ligar-se ao receptor do tipo 1, estruturalmente semelhante ao

receptor de insulina. Esse receptor é expresso na superfície de vários tecidos, exceto no fígado e adipócitos^{69,70}.

O IGF-I circulante encontra-se ligado a seis proteínas ligantes de IGF, denominadas IGFBP-1 até IGFBP-6. Essas proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais, como fosforilação, glicosilação e proteólise. Essas alterações podem modificar as suas afinidades pelo IGF-I. Os IGFBPs exercem papel de proteínas transportadoras na circulação e no meio extracelular, prolongam a meia-vida do IGF-1 e controlam sua liberação metabólica⁷¹.

A forma mais predominante, IGFBP-3, participa da formação de um complexo ternário, cuja massa é 150 KDA. Os constituintes desse complexo são uma molécula de IGFBP-3, uma molécula de IGF-1 e uma glicoproteína (88 KDA), denominada subunidade ácido-volátil (*acid-labile subunit* – ALS). Esse complexo não consegue atravessar o endotélio capilar e atua como um reservatório. A existência deste explica a pequena variação circadiana do IGF-I^{72,73}.

O hormônio IGF-I aumenta a lipólise, a síntese de glicogênio e de proteínas musculares e diminui a degradação de proteína muscular⁷⁴. Uma interessante ação do IGF-I na área esportiva é o aumento da massa muscular. Ratos criados em laboratório, com os nomes sugestivos de “Schwarzenegger”, receberam injeções intramusculares com o gene para IGF-I. Os resultados mostraram de 20% a 30% de aumento nas massas musculares desses roedores, quando comparados com animais controles. Além disso, a expectativa de vida foi maior e a recuperação de lesões, mais rápida^{75,76}. Estudos recentes mostraram o aumento da síntese de colágeno nos tecidos humanos após injeções de IGF-I⁷⁷.

A análise do IGF-I total apresenta a vantagem de ser mais robusta e menos suscetível às variáveis pré-analíticas. Além disso, valores de referência foram estabelecidos para diversas técnicas⁷⁸⁻⁸².

A concentração sérica do IGF-I total varia de acordo com a idade, estado nutricional, fatores hereditários e atividade hormonal (esteroides, insulina, hormônios da tireoide). Os níveis de IGF-I são baixos no nascimento, aumentam durante a infância e têm um pico máximo durante a puberdade. O envelhecimento é acompanhado de uma redução gradual do IGF-I total circulante após a terceira década de vida (10% a cada dez anos)⁸³⁻⁸⁶. Nas análises para quantificar a concentração de IGF-I total é essencial classificar os indivíduos de acordo com a idade. Além da idade, estudos mostraram alta variabilidade entre grupos com pessoas saudáveis, sugerindo, também, a importância de fatores hereditários⁸⁷⁻⁸⁹.

O IGF-I e o P-III-NP podem ser detectados normalmente nos indivíduos. Assim, a comprovação do uso de rhGH é realizada através da detecção de níveis dos marcadores acima daqueles normalmente aferidos nos atletas de elite. Os estudos *GH-2000* e *GH-2004*, através da análise de número significativo de atletas, estabeleceram os valores de referência empregados nos testes de dopagem⁵⁸. Um importante achado desses estudos consiste no fato de que os níveis dos marcadores são dependentes da idade do atleta, sendo que especial cuidado deve ser dispensado no caso de atletas jovens, ainda em fase de crescimento. Esse fato está correlacionado ao padrão de produção do hGH durante a vida, que aumenta durante a puberdade, chegando ao valor máximo no começo da idade adulta e sofrendo declínio posteriormente com o avanço da idade⁶³.

O radioimunoensaio competitivo foi a técnica inicial para a quantificação de IGF-I sérico. O IGF-I circulante está ligado ao IGFBP, e verificou-se que os ensaios sofreram interferência das ligações às proteínas, resultando em valores inexatos e inconsistentes. A cromatografia por filtração de gel ácido foi o método capaz de remover as proteínas interferentes⁹⁰, mas os procedimentos envolvidos nessa técnica são trabalhosos e ela não é usada rotineiramente nos laboratórios. O método mais comum para remover a interferência das proteínas é o deslocamento ácido da IGFBP, com consequente precipitação, deixando o IGF-I livre na amostra⁹¹.

Um problema com essa técnica é que pequenas proteínas ligantes, como, por exemplo, IGFBP1 e IGFBP4, que não se ligam ao ALS, não são removidas completamente durante a etapa de precipitação e permanecem na amostra⁹². Outro problema é a coprecipitação de IGF-I, resultando numa subestimação da concentração do IGF-I⁹³. A técnica de precipitação ácido-etanol pode ser melhorada com a adição de excesso de IGF-II para saturar proteínas ligantes remanescentes após a etapa de precipitação, pois o IGF-II apresenta maior afinidade pelas proteínas ligantes⁹⁴.

As imunoanálises contemporâneas do IGF-I apresentam a tendência de usar o modelo imunométrico não competitivo, pois a especificidade das análises do IGF-I é melhorada com o uso de dois anticorpos em dois sítios anti-gênicos. Além disso, esses ensaios podem ser executados rapidamente com equipamentos automatizados⁹⁵. Entretanto, as etapas pré-analíticas de precipitação com álcool-etanol e/ou adição de excesso de IGF-II são necessárias para minimizar a interferência das proteínas de ligação.

Quando imunoensaios são utilizados em laboratórios *antidoping*, as regras estabelecidas pela WADA exigem a aplicação de dois imunoensaios em cada analito (exemplo: IGF-I), e os anticorpos utilizados nesses

imunoensaios devem reconhecer epítomos diferentes⁹⁶. Não é um requerimento fácil de ser realizado, pois os laboratórios produtores dos testes nem sempre divulgam informações sobre a especificidade do epítomo de seus imunoensaios comerciais. Além disso, os fabricantes podem alterar seus imunoensaios e reagentes sem ampla divulgação e, mais ainda, como apresentado no projeto *GH-2000*, algumas das análises utilizadas nos estudos originais *GH-2000* e *GH-2004* não estão mais disponíveis no mercado. Na prática, kits imunológicos apresentaram resultados inconsistentes para o IGF-I, devido a alterações nas suas composições no decorrer dos anos⁹⁷.

Apesar dos fabricantes seguirem procedimentos operacionais padrão estabelecidos para minimizar variações, é imperativo um sistema de controle de qualidade rigoroso nos ensaios que utilizam o IGF-I⁹⁸. Essa variação limita a comparação de estudos atuais com anteriores. Com o objetivo de resolver esse conflito, pesquisas foram desenvolvidas a fim de alinhar os resultados atuais com os previamente descritos⁹⁹⁻¹⁰¹. A WADA, considerando complicações de natureza jurídica, não pode utilizar essa estratégia de comparações. Atualmente, estão em desenvolvimento limites de decisões específicas para cada análise de IGF-I, quantificando esse hormônio em amostras de atletas de elite⁷⁴.

Imunoensaios são empregados para detecção de IGF-I e P-III-NP. Entretanto, até a data da presente publicação, testes para triagem e confirmação estão sendo desenvolvidos e validados, não estando disponíveis comercialmente para o controle da dopagem. Dessa forma, a abordagem através de marcadores ainda não foi oficialmente aprovada pela WADA⁶⁴.

Além das abordagens anteriormente descritas, outras metodologias estão em desenvolvimento. Técnicas baseadas na aplicação de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) seguida por *immunoblotting*, *microarray* para detecção de alterações da expressão gênica de leucócitos do sangue periférico, identificação de novos e mais eficientes marcadores e métodos por espectrometria de massas e nanotecnologia para detecção da dopagem com hGH têm sido estudados no meio científico e, futuramente, podem vir a ser empregados no controle da dopagem⁵⁸.

22.5.2.4 Eritropoietina

A eritropoietina humana (hEPO) é um hormônio glicoproteico produzido predominantemente nos rins. A hEPO estimula a proliferação e diferenciação dos precursores eritroides, estando diretamente relacionada ao número

de eritrócitos circulantes. Em 1985, o gene da hEPO foi isolado e caracterizado, possibilitando a produção de hormônio eritropoietina recombinante (rhEPO) através de técnicas de biotecnologia¹⁰². No final da década de 1980, a rhEPO foi aprovada para uso terapêutico, possibilitando o tratamento de doenças como insuficiência renal crônica, câncer, insuficiência cardíaca crônica, HIV, hepatite C e doenças autoimunes^{23,102,103}.

A rhEPO é obtida por tecnologia de DNA recombinante, sendo sua produção realizada em células de ovário de *hamster* chinês ou em células renais de filhote de *hamster* nas quais o gene humano da EPO foi transfectado¹⁰⁴. A rhEPO apresenta sequência de 165 aminoácidos idêntica à hEPO. Entretanto, seu padrão de glicosilação é dependente da linhagem celular empregada na produção do hormônio e determina a meia-vida deste no organismo, sendo, portanto, essencial para a atividade biológica¹⁰².

Como citado anteriormente, a disponibilidade comercial da rhEPO tornou possível o tratamento de inúmeras doenças em que a produção endógena encontra-se reduzida ou até mesmo extinta. Tendo em vista o aumento no número de eritrócitos circulantes e, conseqüentemente, no aporte de oxigênio para os músculos, esse hormônio tem sido utilizado por atletas com o objetivo de aumentar o desempenho no esporte, especialmente em modalidades aeróbicas como ciclismo e corrida de longa distância¹⁰². Estudos mostraram que o uso da rhEPO aumenta a disponibilidade de oxigênio no organismo e reduz substancialmente o tempo de exaustão dos atletas^{104,105}. Entretanto, a dopagem no esporte com rhEPO tem sido correlacionada a inúmeros efeitos adversos, como falência cardíaca, infarto do miocárdio, hipertensão, trombose, edema e aplasia de células vermelhas¹⁰⁶.

No ano seguinte à aprovação da rhEPO para uso terapêutico, devido às suspeitas acerca de seu uso na dopagem no esporte, a COI adicionou esse hormônio à Lista de Substâncias Proibidas¹⁰⁷. Apesar da proibição, na época inexistiam métodos capazes de detectar as rhEPO em matrizes biológicas. Tendo em vista as limitações metodológicas, diversas federações esportivas internacionais instituíram métodos indiretos para o controle da dopagem no esporte¹⁰³. Essa abordagem baseia-se na mensuração de parâmetros hematólogicos como hemoglobina, hematócrito e reticulócitos, que sofrem alterações quando da administração de rhEPO. Os resultados aferidos dos atletas são então comparados com os valores de referência da população em geral, já que não são observadas diferenças significativas entre esses grupos para os parâmetros anteriormente citados^{102,104}. Embora os métodos indiretos não possam ser empregados como confirmatórios devido à baixa seletividade e especificidade, durante alguns anos foram a única ferramenta disponível

para o controle da dopagem. Um resultado acima dos limites máximos estabelecidos pelas federações poderia ser utilizado para impedir o atleta de participar da competição devido aos possíveis danos à saúde¹⁰³.

Somente uma década após a inclusão das rhEPO à Lista de Substâncias Proibidas no esporte foi desenvolvida uma metodologia passível de ser utilizada no controle da dopagem^{108,109}. Desde 2003, a detecção direta da rhEPO em sangue e urina faz parte do programa oficial antidopagem, sendo regulada pela WADA¹⁰². Em 2009, a agência divulgou documento técnico¹¹⁰ que descreve a metodologia e os critérios para interpretação dos resultados, visando com isso à harmonização dos testes entre os laboratórios¹⁸. Mais recentemente, esse documento foi atualizado¹⁹. Modificações na descrição inicial do procedimento foram necessárias devido à disponibilidade no mercado de rhEPO com características diferentes daquelas inicialmente comercializadas nos anos 1990, o que tornou ainda mais complexa a detecção desses hormônios em matrizes biológicas¹⁰⁷.

As rhEPOs, devido às diferenças na glicosilação, apresentam carga, massa, composição glicídica e ponto isoelétrico diferente da hEPO, o que permitiu a separação e detecção dos hormônios^{103,105,111}. A rhEPO apresenta carga menos negativa se comparada à hEPO, sendo que o eletroferograma do hormônio exógeno apresenta 4 a 5 bandas na região básica, enquanto o hormônio endógeno apresenta 14 bandas nas regiões básica e ácida¹⁰⁶. Na metodologia oficial da WADA, alíquotas de urina ou sangue são inicialmente submetidas à ultrafiltração, precipitação seletiva de proteínas ou imunopurificação. Posteriormente, realiza-se focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE) para separação das isoformas de rhEPO, seguida por duas etapas de *immunoblotting* (*double-blotting*). No primeiro *immunoblotting*, as proteínas do gel são transferidas e incubadas com anticorpo anti-EPO. O segundo *immunoblotting* é realizado com o objetivo de evitar que proteínas presentes na urina reajam com o anticorpo anti-EPO, resultando em interferências no resultado¹⁰⁷. Para tanto, os anticorpos adsorvidos na primeira membrana são transferidos para uma segunda membrana, enquanto o antígeno e as proteínas interferentes permanecem na primeira membrana. Essa segunda membrana é submetida ao segundo *blotting* com anticorpo com afinidade específica ao anti-EPO, sendo a revelação do gel realizada por quimioluminescência^{23,102}.

O documento técnico da WADA¹¹² também determina que nos casos em que há resultado presuntivo de dopagem com rhEPO, eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), eletroforese em gel de poliacrilamida – lauroil sarcosinato de sódio (SAR-PAGE) ou

cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas devem ser realizadas, visando à confirmação do resultado.

Do ponto de vista metodológico, a detecção da rhEPO é tarefa desafiadora por diversos motivos. Sua concentração em sangue e urina é baixa, a detecção do hormônio exógeno não pode ser realizada através de uma única banda e a EPO endógena apresenta isoformas comuns a algumas das rhEPOs¹⁰². Além disso, os efeitos da administração de rhEPO sobre o aporte de oxigênio para os músculos são mantidos por três semanas após a interrupção do uso do hormônio, mas a janela de detecção do método direto para doses regulares é de poucos dias após a última administração¹⁰³⁻¹⁰⁵. Dessa forma, é essencial que o controle da dopagem no esporte por rhEPO seja realizado também fora dos períodos de competição.

Tendo em vista as limitações da metodologia direta para a detecção de rhEPO, a WADA tem patrocinado diversas pesquisas com o objetivo de aprimorar o método vigente e desenvolver novos métodos⁵⁹. Atualmente, a abordagem que emprega o imunoensaio de isoformas assistido por membrana (*membrane-assisted isoform immunoassay* – MAIIA) tem sido proposta a fim de complementar a metodologia anteriormente descrita. Apesar de esse método apresentar resultados promissores para o controle da dopagem, até o presente momento não foi aceito oficialmente pela WADA^{103,107}.

22.5.2.5 Hormônio luteinizante e gonadotrofina coriônica humana

O hormônio luteinizante (LH) e a gonadotrofina coriônica (hCG) são hormônios glicoproteicos compostos por duas cadeias de polipeptídios, sendo uma delas a subunidade α , comum aos demais hormônios dessa família, e outra a subunidade β , que determina a atividade biológica do hormônio¹¹³. Em mulheres, o LH sintetizado na hipófise desencadeia a ovulação e estimula a síntese de progesterona e estrógeno⁵⁹. O hCG, por sua vez, é produzido em abundância pelas células trofoblásticas placentárias durante a gestação, estimulando a produção de hormônios esteroides nos ovários. Também é produzido por alguns tipos de tumores^{113,114}.

Em indivíduos do sexo masculino, ambos os hormônios agem sobre as células de Leydig estimulando a produção de testosterona sem que, entretanto, a razão testosterona/epitestosterona, utilizada na detecção da dopagem no esporte com testosterona exógena, seja alterada^{59,115}. Dessa forma, o LH e o hCG são utilizados pelos atletas como agentes indiretos na dopagem

no esporte, com o objetivo de aumentar a produção endógena de testosterona ou normalizá-la nos casos de administração prolongada de esteroides anabolizantes, já que esta última acarreta supressão da síntese endógena. De maneira oposta, o LH e o hCG não são proibidos pela WADA para atletas do sexo feminino, já que a administração de tais hormônios apresenta efeitos negligenciáveis sobre os níveis de testosterona e, consequentemente, sobre o desempenho esportivo. Ademais, no caso do hCG, hormônio utilizado como marcador de gravidez, seu monitoramento pode representar invasão da privacidade da atleta⁵⁹.

O hCG e o LH são empregados com fins terapêuticos em mulheres nos casos de reprodução assistida, com o objetivo de estimular a ovulação, e em homens no tratamento da infertilidade associada ao hipogonadismo. Atualmente, hormônios recombinantes estão disponíveis comercialmente para uso terapêutico, facilitando a utilização na dopagem no esporte. O LH apresenta reduzida meia-vida no organismo, sendo necessárias doses consideravelmente altas para que seja obtido aumento da produção de testosterona. No caso do hCG, a meia-vida do hormônio é maior devido à glicosilação do peptídeo. Isso faz com que os efeitos sobre a produção de testosterona sejam mais pronunciados, tornando esse hormônio mais atraente do ponto de vista da dopagem no esporte¹¹⁵. Embora o hCG não seja amplamente utilizado por atletas, desde sua proibição, em 1987, alguns casos foram detectados no esporte⁵⁹.

A detecção da dopagem no esporte por hCG e LH é realizada em amostras de urina através de imunoensaios, que também são empregados para fins clínicos. A WADA determina que dois imunoensaios com características distintas são necessários para confirmação de um resultado positivo, sendo que no caso do hCG ambos devem apresentar limite de detecção de pelo menos 5 UI/L¹¹⁶. De maneira geral, os imunoensaios disponíveis comercialmente para detecção de hCG e empregados no controle da dopagem no esporte baseiam-se no princípio “*sandwich*”, que consiste em anticorpos de captura que estão imobilizados em fase sólida e anticorpos ligados a enzimas, compostos luminescentes ou fluorescentes, para mensuração do antígeno. A maior parte dos ensaios empregam anticorpos monoclonais; entretanto, alguns são compostos por anticorpos monoclonais e soro policlonal.

Recentemente, métodos que empregam a imunoextração e a espectrometria de massas foram desenvolvidos com o objetivo de serem utilizados como testes confirmatórios da dopagem no esporte com hCG. Entretanto, não há relatos da utilização dessa metodologia no controle da dopagem.

Sob condições normais, pequenas quantidades desse hormônio são secretadas pela hipófise de homens e mulheres, sendo a concentração sérica circulante inferior a 5 UI/L¹¹⁴.

22.6 DOPAGEM GENÉTICA

Avanços tecnológicos têm permitido, nos anos recentes, o emprego de ferramentas genéticas para o tratamento de diversas patologias. A terapia genética, mais especificamente, pode ser definida como a transferência de material genético (transgene) para células humanas com o objetivo de substituir um gene defeituoso ou estimular a síntese endógena de proteínas¹¹⁷. Doenças como diabetes, anemia, distrofias musculares e deficiências do sistema imunológico são alvos de pesquisas para o emprego terapêutico de modificação genética de sítios específicos do genoma humano. Apesar da eficácia demonstrada em alguns modelos animais, atualmente somente dois medicamentos de terapia genética foram aprovados internacionalmente para comercialização¹¹⁸. Ademais, a terapia genética ainda é considerada de alto risco e necessita de aprimoramentos. Efeitos adversos sérios, como leucemia, respostas imunológicas exacerbadas e até mesmo mortes, já foram relatados em estudos clínicos com terapia genética em humanos¹¹⁹.

Os benefícios da terapia genética podem favorecer inúmeros pacientes. Entretanto, o aprimoramento e a disponibilidade de tais tratamentos podem fazer com que estes venham a ser utilizados por atletas com o objetivo de aumentar o desempenho esportivo¹¹⁸. Por esse motivo, em 2004 a WADA adicionou à Lista de Substâncias Proibidas no esporte a dopagem genética, que foi definida como “o uso não terapêutico de genes, elementos genéticos e/ou células que apresentem capacidade de aumentar o desempenho esportivo”¹²⁰. A versão de 2014 da Lista de Substâncias Proibidas proíbe “a transferência de ácidos nucleicos ou sequências de ácidos nucleicos” e “o uso de células normais ou geneticamente modificadas” que apresentam potencial de aumentar o desempenho esportivo do atleta¹⁹. Apesar dos esforços, o controle da dopagem genética consiste tarefa desafiadora para os laboratórios e órgãos reguladores, já que sua detecção em amostras biológicas, devido às características da terapia e às similaridades com compostos endógenos, é bastante complexa¹¹⁷.

Na terapia gênica, os genes responsáveis pela produção de determinada molécula com função biológica são identificados e inseridos no organismo humano através de técnicas *in vivo* e *ex vivo*. A abordagem *in vivo* consiste

na produção do gene de interesse em plasmídeo bacteriano, purificação deste e injeção direta do DNA no tecido-alvo. Sendo essa técnica pouco efetiva, atualmente empregam-se vetores virais que transferem o material genético de interesse para células-alvo do hospedeiro¹¹⁸. Nesse caso, o DNA e o RNA viral responsáveis pela replicação e patogenicidade são suprimidos, reduzindo a imunogenicidade do vírus¹²¹. A técnica *ex vivo*, por sua vez, consiste na retirada de células do organismo do paciente, seguida de cultura destas, após o que o gene de interesse é inserido no DNA celular, sendo as células reintroduzidas no organismo do paciente⁴⁰.

Quando introduzido no organismo, seja por técnicas *in vivo* ou *ex vivo*, o transgene é transcrito pela maquinaria celular, gerando proteína ou hormônio potencialmente indistinguível do endógeno¹¹⁷. Essa similaridade, importante para que o tratamento não seja alvo de respostas imunológicas no paciente, é também um atrativo para atletas que desejam alterar seu desempenho esportivo sem serem detectados nos testes de controle da dopagem no esporte¹²². Diversos genes atualmente sob estudo apresentam potencial para melhora do desempenho esportivo. Dentre eles, vale citar os genes da eritropoietina (hEPO), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), hormônio do crescimento humano (GH), antagonistas de miostatina e endorfinas e encefalinas¹¹⁸.

A eritropoietina, como citado anteriormente, é um hormônio amplamente utilizado por atletas com o objetivo de aumentar a produção de eritrócitos e, conseqüentemente, a capacidade de oxigenação do organismo. A terapia gênica envolvendo o gene da hEPO já foi testada *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de tratar patologias em que a produção desse hormônio esteja comprometida¹¹⁸. Estudos mostraram aumento na produção do hormônio; entretanto, devido a problemas de segurança, até a presente data nenhuma terapia gênica com esse fim foi aprovada para uso em humanos¹¹⁷.

Além da eritropoietina, o gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também pode ser alvo da dopagem genética por atletas que almejam melhora da capacidade aeróbica. O VEGF é uma proteína com importante papel sobre a angiogênese^{118,121}. A terapia gênica com VEGF poderia ser usada por atletas como alternativa à dopagem sanguínea, visando ao aumento no transporte de oxigênio através do estímulo da angiogênese na musculatura e nos sistemas cardiovascular e pulmonar. No âmbito terapêutico, o VEGF tem sido estudado com o objetivo de tratar doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e doença arterial periférica¹¹⁷. Entretanto, até o momento, seu sucesso é limitado, já que a angiogênese é um processo complexo que envolve a interação entre inúmeros fatores angiogênicos¹²³.

No que se refere aos atletas de modalidades em que a massa muscular é importante para o desempenho esportivo, algumas proteínas e hormônios podem ser alvo de dopagem genética. Como citado anteriormente, o hormônio do crescimento (hGH) apresenta efeitos anabólicos sobre a musculatura e aumento do metabolismo de carboidratos e lipídios, sendo um dos principais agentes utilizados na dopagem no esporte⁵⁹. Além desse hormônio, o IGF-I, proteína produzida no fígado em resposta ao estímulo do hGH, é o principal mediador dos efeitos desse hormônio. O IGF-I previne a perda de massa muscular relacionada ao envelhecimento e, em indivíduos saudáveis, causa hipertrofia muscular e cicatrização após dano muscular¹¹⁷.

Tendo em vista os efeitos fisiológicos do IGF-I e hGH, seus genes podem ser alvo de dopagem genética. No âmbito terapêutico, métodos visando ao aumento da produção endógena de IGF-I são de interesse médico no tratamento de doenças degenerativas musculares, câncer, HIV e envelhecimento, condições nas quais os pacientes apresentam considerável perda de massa muscular¹¹⁸. Estudos com animais de experimentação mostraram aumento da massa muscular e redução da degradação muscular em decorrência do envelhecimento¹¹⁷. No caso da dopagem genética, o aumento na produção de IGF-I pode ser obtido não somente através da dopagem genética direta, mas também através de seu aumento indireto, via hGH. Este último hormônio age sobre um número maior de processos no organismo, de modo que os efeitos da manipulação gênica de hGH seriam mais inespecíficos, se comparados ao IGF-I.

A miostatina apresenta efeito negativo sobre o crescimento do músculo esquelético, sendo que a deleção ou mutação de seu gene acarreta hiperplasia e hipertrofia com aumento da massa muscular¹¹⁷. Atualmente, o silenciamento do gene de miostatina vem sendo estudado como alternativa terapêutica para o tratamento de distrofias musculares¹²³. Entretanto, devido à sua ação sobre a musculatura esquelética, este também seria um candidato à dopagem no esporte.

O emprego da terapia gênica envolvendo encefalinas e endorfinas tem sido avaliado em estudos clínicos para o tratamento da dor crônica associada a determinadas doenças, como o câncer¹²². Ensaios clínicos em humanos apresentaram resultados promissores, podendo essas substâncias ser empregadas no tratamento de dores locais e específicas com poucos efeitos adversos e baixo potencial de abuso, se comparadas aos opioides¹¹⁸. No caso da dopagem no esporte, a redução da percepção de dor durante o exercício permitiria aos atletas maior esforço físico e, conseqüentemente, melhora no desempenho esportivo.

Apesar dos diversos estudos em andamento, até o momento nenhum caso de dopagem gênica foi relatado. Entretanto, com o contínuo desenvolvimento da terapia gênica, essa é uma ameaça cada vez mais iminente. Como já dissemos, a detecção da dopagem genética é desafiadora, já que, em alguns casos, a proteína expressa pode ser idêntica à proteína endógena. Ademais, se o transgene é responsável pela expressão de proteínas ou moléculas de RNA que ficam restritas ao interior da célula ou ao sítio de sua produção, a detecção só se faz possível através de biópsia do tecido¹²².

Tradicionalmente, o controle da dopagem no esporte é realizado através da detecção da substância ou de seus produtos de biotransformação (metabólitos) em amostras biológicas e de marcadores de efeitos¹¹⁹. Até o presente momento, nenhum método específico para detecção da dopagem genética foi aprovado pela WADA ou utilizado pelos laboratórios acreditados¹¹⁸. Mas, apesar das limitações, algumas abordagens têm sido propostas para o controle da dopagem genética.

De maneira geral, os métodos empregados no controle da dopagem no esporte podem ser divididos em diretos e indiretos. No caso dos métodos diretos, a detecção direta em amostras biológicas das proteínas codificadas pelo gene modificado seria uma abordagem pouco provável, já que muitas delas estão presentes em níveis não detectáveis¹¹⁸. Entretanto, em alguns casos, modificações pós-translacionais características dos diferentes tipos celulares, podem permitir a diferenciação entre a proteína endógena e aquela produzida através do transgene, de maneira análoga à detecção da dopagem no esporte por rhEPO¹²². Nesse caso, a focalização isoeletrica poderia ser empregada para detecção da dopagem¹¹⁷.

Além da detecção das proteínas, uma alternativa seria a detecção direta do vetor no organismo do atleta. Para tanto, uma estratégia proposta seria a biópsia do local de infecção. Apesar de apresentar janela de detecção relativamente grande, essa abordagem apresenta limitações, já que o conhecimento da área corporal em que foi realizada a inserção é necessário e, de maneira geral, a biópsia é considerada procedimento invasivo, não sendo empregado no controle da dopagem¹¹⁷. Técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) em matrizes biológicas como sangue e urina também têm sido preconizadas, entretanto, apresentam limitações já que falsos positivos são possíveis nos casos em que o atleta foi infectado por um vírus comum e a janela de detecção é reduzida^{118,123}.

Outra possibilidade para detecção direta da dopagem genética baseia-se no emprego de testes moleculares para diferenciação entre o DNA genômico e o DNA complementar. Este último não apresenta íntrons em sua

estrutura, podendo ser distinguido do DNA genômico através da PCR e de *Southern blotting*¹²⁴.

Analogamente à indústria agrícola, a adição de marcador ao transgene possibilitaria a detecção, por técnica de PCR, da dopagem com medicamentos de terapia gênica¹¹⁸. Entretanto, essa marcação pode acarretar aumento da imunogenicidade e comprometimento da eficácia. Ademais, poderia representar custos maiores para as indústrias farmacêuticas, que podem não aceitar esse tipo de procedimento¹¹⁷. Tendo em vista suas desvantagens, atualmente é pouco provável que a marcação da terapia gênica seja adotada visando ao controle da dopagem no esporte.

Diferentemente dos métodos diretos, a abordagem indireta baseia-se na avaliação dos efeitos da modificação genética em células, tecidos ou no organismo como um todo¹²⁴. Para tanto, a detecção de possíveis respostas imunes aos vetores da terapia gênica e às proteínas resultantes do transgene pode ser utilizada¹¹⁸. Essa técnica, entretanto, apresenta desvantagem, pois, no caso de vetores virais, não permite a diferenciação entre uma infecção natural e a introdução intencional do vetor no organismo¹¹⁷.

Recentemente, o uso do transcriptoma, que consiste na mensuração de mRNA do organismo, tem sido proposto no controle da dopagem genética. As análises, através de PCR em tempo real (*real-time PCR*) e microarranjos (*microarray*), permitiriam identificar mudanças na expressão gênica e, conseqüentemente, a dopagem genética¹²⁴. Além dessa, técnicas de proteômica, através de separação por eletroforese bidimensional, eletroforese capilar ou cromatografia líquida bidimensional, e identificação e quantificação por espectrometria de massas, permitem a detecção e quantificação de inúmeras proteínas expressas no organismo. Alguns grupos específicos, por exemplo, poderiam ser utilizados como marcadores da dopagem no esporte. A metabolômica, por sua vez, através da análise de metabólitos de baixa massa molecular, permitiria avaliar mudanças na função celular, acarretadas pela dopagem genética¹²⁵. Contudo, algumas limitações práticas desses procedimentos incluem a necessidade de testes regulares dos atletas e a determinação de níveis de referência. Além disso, alguns atletas podem apresentar mutações e polimorfismos no material genético, que seriam responsáveis por alterações metabolômicas sem que haja, entretanto, ocorrência de dopagem¹¹⁷.

22.7 SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

O uso de suplementos nutricionais por atletas é uma preocupação, pois em muitos países a fabricação e rotulagem dos suplementos podem não seguir regras rígidas, o que pode levar a um suplemento que contenha uma substância não declarada e proibida de acordo com os regulamentos *antidoping*. Um número significativo de testes positivos foi atribuído ao mau uso de suplementos. Ingerir um suplemento alimentar mal rotulado não é uma defesa adequada para a acusação de dopagem¹⁸.

Na Tabela 22.3, são mostradas algumas substâncias proibidas pela lista-gem da WADA e que foram encontradas em suplementos nutricionais cujos rótulos os declaravam como “não hormonais”¹²⁶.

Tabela 22.3 Incidência de substâncias proibidas pela WADA em suplementos nutricionais rotulados como “não hormonais” no período de dezembro de 2002 a agosto de 2005, analisados no Laboratório de Controle de *Doping* de Ghent (Bélgica), acreditado pela WADA

| SUBSTÂNCIA ENCONTRADA | QUANTIDADE (n) |
|--------------------------------|----------------|
| De-hidroepiandrosterona | 27 |
| Testosterona | 18 |
| 4-Androsteno-3,17-diona 16 | 16 |
| 19-Nor-4-Androsteno-3,17-diona | 9 |
| Di-hidrotestosterona 8 | 8 |
| Nandrolona | 5 |
| 5-Androsteno-3b, 17b-diol 5 | 5 |
| 17a-Metiltestosterona | 2 |

A Comissão Médica do COI realizou, em alguns países, análises em suplementos para detectar esteroides anabolizantes. Os fabricantes dos suplementos não conformes omitiram nos rótulos dos produtos estudados a presença de substâncias proibidas pela WADA¹²⁷. Os resultados são mostrados na Tabela 22.4.

Tabela 22.4 Resultados de análises de suplementos nutricionais, realizadas pelo Comitê Olímpico Internacional (COI)

| PAÍS | TOTAL ANALISADO | RESULTADOS POSITIVOS | PORCENTAGEM DE RESULTADOS POSITIVOS (%) |
|----------------|-----------------|----------------------|---|
| Países Baixos | 31 | 8 | 25,8 |
| Reino Unido | 37 | 7 | 18,9 |
| Estados Unidos | 240 | 45 | 18,8 |
| Itália | 35 | 5 | 14,3 |
| Alemanha | 129 | 15 | 11,6 |

A Tabela 22.3 mostra uma significativa proporção de produtos contaminados com substâncias banidas pela WADA e não listadas pelos fabricantes dos suplementos analisados.

A efedrina, um estimulante presente na listagem da WADA, cuja concentração na urina acima do permitido é considerada *doping*¹⁹, também foi encontrada em suplementos alimentares. Frequentemente é citada como um “produto natural”. Seu uso pode acarretar problemas cardiovasculares, inclusive morte súbita¹²⁷.

A preocupação com as informações presentes nos rótulos encontra-se no Artigo 10 do Decreto 6.653 de 2008¹⁶. Consta neste documento a necessidade da agência regulatória federal encorajar o estabelecimento de boas práticas de comercialização e distribuição de suplementos nutricionais entre os produtores, incluindo o fornecimento de informações relativas à composição analítica e garantia de qualidade.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC n° 18/2010¹²⁸, estabeleceu a seguinte classificação dos suplementos para uso nas atividades físicas:

- Suplemento hidroeletrólítico.
- Suplemento energético.
- Suplemento proteico.
- Suplemento para substituição parcial de refeições.
- Suplemento de creatina.
- Suplemento de cafeína.

Existem situações nas quais é possível aos atletas o uso de substâncias ou métodos não permitidos presentes nas listagens da WADA. Para isso, os

médicos dos atletas devem solicitar “autorizações para uso terapêutico”. Se a WADA considerar que a concessão ou recusa de uma autorização de uso para fins terapêuticos não respeitou a norma internacional referente a autorizações para fins terapêuticos, a WADA poderá anular essa decisão¹⁸.

22.8 CONCLUSÕES

A busca humana pela superação de seus próprios limites por meio do uso de substâncias e métodos manipulados pelo próprio homem ocorre desde os tempos mais remotos da origem da vida humana. Frutas, raízes, poções com excrementos, hormônios animais e humanos, naturais e sintéticos são alguns exemplos de substâncias utilizadas. Estimulantes e hormônios utilizados durante as Grandes Guerras Mundiais encontraram, nos eventos esportivos, um amplo comércio. Muitos atletas consideram o esporte como a única forma de ascensão social, *status*, prestígio e reconhecimento, de modo que pressões dos familiares, patrocinadores, técnicos e colegas de equipe resultam na utilização de substâncias e métodos proibidos.

A biotecnologia contribui de maneira significativa para o cenário do *doping*. O desenvolvimento de hormônios sintéticos e similares, inicialmente na área clínica, proporcionou o surgimento de moléculas interessantes para melhora do desempenho dos competidores. A evolução tecnológica dos exames antidopagem resultou em métodos capazes de detectar substâncias presentes há algumas décadas nos esportes. Porém, novas drogas proibidas pelas agências regulatórias surgem a uma velocidade muito maior que as validações de metodologias comprovadas cientificamente para exames de controle do *doping*.

22.9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como resultado dos avanços biotecnológicos, a indústria farmacêutica continuamente disponibiliza para comercialização novos medicamentos. Parte considerável dessas novas substâncias são proteínas e peptídeos recombinantes que apresentam grande similaridade aos compostos endógenos. A esse fato associam-se particularidades das substâncias e do padrão de administração, tornando o controle da dopagem no esporte um desafio metodológico crescente¹²⁹. Dessa forma, estratégias de monitoramento que permitam a identificação de atletas dopados de maneira independente do

desenvolvimento farmacológico têm sido preconizadas no controle da dopagem no esporte.

Essa abordagem, sob o nome de Passaporte Biológico, baseia-se no contínuo monitoramento de determinados biomarcadores presentes em amostras biológicas dos atletas. De maneira análoga ao que ocorre na medicina preventiva, o acompanhamento individual dos atletas permitiria detectar alterações das condições fisiológicas normais, indicando indiretamente a ocorrência de dopagem²³. Alterações em parâmetros hematológicos específicos podem, por exemplo, indicar a utilização de métodos ou substâncias que acarretam aumento no transporte de oxigênio. Mais recentemente, as tecnologias “ômicas” (proteômica e metabolômica) demonstraram potencial de diagnóstico para diferentes doenças e também para a identificação de marcadores da dopagem¹²⁹.

Apesar de promissor, o passaporte biológico ainda apresenta aplicação limitada no controle da dopagem. Até a data desta publicação, somente o protocolo para marcadores hematológicos havia sido validado, tendo sido implementado pela União Internacional de Ciclismo em 2008 e, em 2009, aprovado pela WADA^{130,131}. Entretanto, avanços tecnológicos podem permitir que esta venha a ser uma ferramenta na busca de violações das regras antidopagem, assim como no direcionamento dos tradicionais testes empregados no controle da dopagem.

REFERÊNCIAS

1. Lippi G, Guidi G. Doping and sports. *Minerva Medicine*. 1999;90(9):345-57.
2. Paiva CC, Doneda D, Dias DV, de Rose EH, Cordeiro JMS, da Costa LP, Bucher R, Santin S. Valores Humanos, Corpo e Prevenção. A procura de Novos Paradigmas para a Educação Física. Brasil, Ministério da Educação; 1989.
3. Csáky TZ. Doping. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 1972;12(2):117-23.
4. De Rose EH, Neto Aquino FR, Levy R. Informações sobre Uso de Medicamentos no Esporte. Rio de Janeiro: Comitê Olímpico Brasileiro; 2010.
5. World Anti-Doping Agency (WADA). A Brief History of Anti-doping. c. 2010 [Internet]. [Cited 2013 Dec 3]. Available from: <http://www.wada-ama.org/en/about-wada/history/>.
6. Boje O. *Bulletin of the Health Organization of the League of Nations*. 1939;8:439-69.
7. Hoberman J. *Mortal Engines: The Science of Performance and the Dehumanization of Sport*. New York: Free Press; 1922.
8. Donohoe T, Johnson N. *Foul play: Drug use in sport*. Oxford: Blackwell; 1986.
9. Connolly H. Hearings before the Subcommittee to Investigate Juvenile Delinquency (testimony before the Committee on the Judiciary, United States Senate). Ninety-third Congress, first session. 1973 Jun 18, Jul 12-13.
10. Gilbert B. Drugs in sport: Part 1. Problems in a turned-on world. *Sports Illustrated*. 1969;64-72.
11. Payne AH. Anabolic steroids in athletics. *British Journal of Sports Medicine*. 1975;9:83-8.
12. Todd T. Anabolic steroids: The gremlins of sport. *Journal of Sport History*. 1987;14:87-107.
13. Williams M. Blood doping in sports: A review. *Journal of Drug Issues*, 1980;10(3), 331-9.
14. Fraser AD. Doping control from a global and national perspective. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2004;26:171-4.
15. Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. *Fundamentos de Toxicologia*. 3. ed. São Paulo: Ateneu; 2008.
16. Brasil. Decreto n. 6.653. 18 Nov 2008.
17. Brasil. Decreto n. 7.630. 30 Nov 2011.
18. World Anti-Doping Agency (WADA). *World Anti-doping Code*. 2009.
19. World Anti-Doping Agency (WADA). *The World Anti-Doping Code. The 2014 Prohibited List. International Standard*.
20. Dickman S. East Germany: Science in the disservice of state. *Science*. 1991;254:26-7.

21. Donike M, Jaenick L, Stratmann D, Hollmann W. Gas chromatographic detection of nitrogen-containing drugs in aqueous solutions by means of the nitrogen detector. *J Chromatogr.* 1970;52(2):237-50.
22. Neto-Aquino FR. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 2001;7(4):138-48.
23. Catlin DH, Fitch KD, Ljungqvist A. Medicine and science in the fight against doping in sport. *Journal of Internal Medicine.* 2008;264:99-114.
24. Todd J, Todd T. Significant events in the history of drug testing and the Olympic movement: 1960-1999. In: Wilson W, Derse E, editors. *Doping in Elite Sport*, Champaign: Human Kinetics; 2001. p. 65-128.
25. Bamberger M, Yaeger D. Over the edge. *Sports Illustrated.* 1997;15:60-70.
26. Cramer RB. Olympic cheating: The inside story of illicit doping and the U.S. cycling team. *Rolling Stone.* 1985 Feb:25-30.
27. Zorpette G. The chemical games: Blood doping breakthrough. *Scientific American.* 2000 Sep.
28. Janofsky M. System accused of failing test posed by drugs. *New York Times.* 1988 Nov 17.
29. Dubin C. Commission of inquiry into the use of drugs and banned practices intended to increase athletic performance (catalogue no. CP32-56/1990E). Ottawa: Canadian Government Publishing Center; 1990
30. Abrahamson A, Wharton D. Behind the rings: Inside the Olympic movement. *Los Angeles Times.* 2000 Aug 20:1A.
31. Longman J. Struggles threaten U.S. Olympic movement. *New York Times.* 2000 Nov 26.
32. Begley S, Clifton T. The drug charade. *Newsweek.* 2000 Sep 11:42-5.
33. Cazeneuve B, Layden T. Inside Olympic sport. *Sports Illustrated.* 2000 Aug 14:67.
34. Fish M. 2000 Olympics: Tests nearly useless as new drugs pop up. *Atlanta Journal and Constitution.* 2000 Sep 9:12F.
35. Harvey R. Ignoring steroid issue is a national pastime. *Los Angeles Times.* 2000 Oct 15.
36. Humphries T. Late operation on blind eye. *Irish Times.* 2000 Sep:63.
37. Reid S. The obvious answer. *Orange County Register.* 2000 Aug 6:1D.
38. Sullivan R, Song S. Are drugs winning the Games? *Time.* 2000 Sep 11:90-2.
39. World Anti-Doping Agency (WADA). Accredited Laboratories for Doping Control Analysis. 2013 [Internet]. [Cited 2013 Dec 4]. Available from: <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Anti-Doping-Laboratories/Accredited-Lab-Locations/Americas/>.
40. Azzazy HM, Mansour MM, Christenson RH. Doping in the recombinant era: strategies and counterstrategies. *Clinical Biochemistry.* 2005;38:959-65.

41. Tashkin DP, Fabbri LM. Long-acting beta-agonists in the management of chronic obstructive pulmonary disease: current and future agents. *Respir Res.* 2010;11:149-63.
42. Chung KF, Caramori G, Adcock IM. Inhaled corticosteroids as combination therapy with β -adrenergic agonists in airways disease: present and future. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010;65:853-71.
43. Mapel DW, Hurley JS, Dalal AA, Blanchette CM. The role of combination inhaled corticosteroid/long-acting β -agonist therapy in COPD management. *Prim Care Respir J.* 2010;19:93-103.
44. Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD. Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2 -receptor agonist. *Am J Physiol.* 1988;254:726-32.
45. Ryall JG, Sillence MN, Lynch GS. Systemic administration of β_2 -adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *Br J Pharmacol.* 2006;147:587-95.
46. Fragkaki AG, Georgakopoulos C, Sterk S, Nielen MWF. Sports doping: Emerging designer and therapeutic β_2 agonists. *Clinica Chimica Acta.* 2013;425:242-58.
47. Jackson EK. Diuretics. In: Brunton L, Lazo J, Parker K, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11. ed. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 737-70.
48. Cadwallarder A, de La Torre X, Tieri A, Botrè F. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis. *British Journal of Pharmacology.* 2010;161:1-16.
49. Hemmersbach P, de la Torre R. Stimulants, narcotics and β -blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control. *Journal of Chromatography B.* 1996;687:221-38.
50. Trout GJ, Kazlauskas R. Sports drug testing – an analyst's perspective. *Chem Soc Rev.* 2004;33:1-13.
51. Hilderbrand RL. High-Performance Sport, Marijuana, and Cannabimimetics. *Journal of Analytical Toxicology.* 2011;35: 624-37.
52. Campos DR, Yonamine M, de Moraes Moreal RL. Marijuana as Doping in Sports. *Sports Med.* 2003;33(6):395-9.
53. Hall W. Adverse health effects of non-medical cannabis use. *Lancet.* 2009;374:1383-91.
54. Eichner ER. Ergolytic drugs in medicine and sports. *Am J Med.* 1993;94(2):205-11.
55. Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 2004;8:513-54.
56. Duntas LH, Popovic V. Hormones as doping in sports. *Endocrine.* 2013;43(2):303-13.
57. Dvorak J, Feddermann N, Grimm K. Glucocorticosteroids in football: use and misuse. *Br J Sports Med.* 2006;40(I):48-54.

58. Barroso O, Schamasch P, Rabin O. Detection of GH abuse in sport: Past, present and future. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(4):369-74.
59. Barroso O, Mazzoni I, Rabin O. Hormone abuse in sports: the antidoping perspective. *Asian J Androl.* 2008;10(3):391-402.
60. Holt RI, Erotokritou-Mulligan I, Sönksen PH. The history of doping and growth hormone abuse in sport. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(4):320-6.
61. Holt RI, Sönksen PH. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. *Br J Pharmacol.* 2008;154(3):542-56.
62. Ding J, List EO, Okada S, Kopchick JJ. Perspective: proteomic approach to detect biomarkers of human growth hormone. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(4):399-407.
63. Holt RI. Detecting growth hormone abuse in athletes. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401(2):449-62.
64. Jing J, Yang S, Zhou X, He C, Zhang L, Xu Y, Xie M, Yan Y, Su H, Wu M. Detection of doping with rhGH: excretion study with WADA-approved kits. *Drug Test Anal.* 2011;3(11-12):784-90.
65. Baumann GP. Growth hormone doping in sports: a critical review of use and detection strategies. *Endocr Rev.* 2012;33(2):155-86.
66. Daughaday WH, Salmon WD, Van Den Brande JL, Van Wyk JJ. On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;65:1075-6.
67. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor-I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(13):7324-9.
68. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16:3-34.
69. Bolinder J, Lindblad A, Engfeldt P, Arner P. Studies of acute effects of insulin-like growth factors I and II in human fat cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;65:732-7.
70. Caro JF, Poulos J, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Sinha MK. Insulin-like growth factor 1 binding in hepatocytes from human liver, human hepatoma, and normal regenerating, and fetal rat liver. *J Clin Invest.* 1988;81:976-81.
71. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev.* 1997;18:801-31.
72. Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the labile subunit. *J Biol Chem.* 1998;273:6074-9.
73. Finth SM, Ganeshprasad U, Baxter RC. Structural determinants of ligand and cell surface binding of insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem.* 1998;273:2631-8.

74. Guha N, Cowan DA, Sönksen PH, Holt RIG. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) misuse in athletes and potential methods for detection. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405:9669-83.
75. Barton-Davis ER. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1998;95 (26):15603-7.
76. Lee S, Barton ER, Sweeney HR, Farrar RP. Viral expression of insulin like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol.* 2004;96:1097-104.
77. Hansen M, Boesen A, Holm L, Flyvbjerg A, Langberg H, Kjaer M. Local administration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates tendon collagen synthesis in humans *Scand J Med Sci Sports.* 2013;23:614-9.
78. Kawai N, Kangasi S, Takano-Watou S. Serum free insulin-like growth factor-I (IGF-I), total IGF-I and IGF-binding protein-3 concentrations in normal children and children with growth hormone deficiency. *Metabolism.* 1999;84: 82-9.
79. Juul A, Bang P, Hertel NT. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size and body mass index. *J Clin Metab.* 1994;78:744-52.
80. Yamamoto H, Sohmiya M, Oka N, Kato Y. Effects of aging and sex on plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels in normal adults. *Acta Endocrinol.* 1991;124:497-500.
81. Paolisso G, Ammendola S, del Buono A. Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy centenarians: relationship with plasma leptin and lipid concentrations, insulin action, and cognitive function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2204-9.
82. Hilding A, Hall K, Wivall-Helleryd IC. Serum levels of insulin-like growth factor-I in 152 patients with growth hormone deficiency aged 19–82 years in relation to IGF-I in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2013-9.
83. Landin-Wilhelmsen K, Wilhelmsen L, Lappas G. Serum insulin-like growth factor-I in a random population sample of men and women: relation to age, sex, smoking habits, coffee consumption and physical activity, blood pressure and concentrations of plasma lipids, fibrinogen, parathyroid hormones and osteocalcine. *Clin Endocrinol.* 1994;41:351-7.
84. D'Costa AP, Ingram RL, Leham JE, Sonntag WE. The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor-I during normal ageing. *J Reprod Fert Suppl.* 1993;46:87-98.
85. Copeland KC, Colletti RB, Devlin JT, McAuliffe TL. The relationship between insulin-like growth factor 1, adiposity and aging. *Metabolism.* 1990;39:584-7.

86. Harris TB, Kiel D, Roubenoff R. Association of insulin-like growth factor-I with body composition, weight history, and past health behaviors in the very old: the Framingham Heart Study. *J Am Geriatr Soc.* 1997;45:133-9.
87. Grogean T, Vereault D, Millard PS, Kiel D, MacLean D, Orwoll E, Greenspan S, Rosen CJ. A comparative analysis of methods to measure IGF-I in human serum. *Endocr Metab.* 1997;4:109-14.
88. Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, Witte S, Rogers J, Bilezikian JP. Association between serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and a simple repeat in IGF-I gene-implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2286-90.
89. Hong Y, Pedersen NL, Brismar K, Hall K, de Faire U. Quantitative genetic analyses of insulin-like growth factor-I (IGF), IGF binding protein-1 (IGFBP-1) and insulin levels in middle-aged and elderly twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:1791-7.
90. Daughaday WH, Ward AP, Goldberg AC, Trivedi B, Kapadia M. Characterization of somatomedin binding in human serum by ultracentrifugation and gel filtration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;55:916-21.
91. Daughaday WH, Parker KA, Borowsky S, Trivedi B, Kapadia M. Measurement of somatomedin-related peptides in fetal, neonatal, and maternal rat serum by insulin-like growth factor (IGF) I radioimmunoassay, IGF-II radioreceptor assay (RRA), and multiplication-stimulating activity RRA after acid – ethanol extraction. *Endocrinology.* 1982;110(2):575-81.
92. Mesiano S, Young IR, Browne CA, Thorburn GD. Failure of acid – ethanol treatment to prevent interference by binding proteins in radioligand assays for the insulin-like growth factors. *J Endocrinol.* 1988;119(3):453-60.
93. Clemmons DR. IGF-I assays: current assay methodologies and their limitations. *Pituitary.* 2007;10(2):121-8.
94. Blum WF, Breier BH. Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regul.* 1994;4(1):11-9.
95. Khosravi MJ, Diamandi A, Mistry J, Lee PD. Noncompetitive ELISA for human serum insulin-like growth factor-I. *Clin Chem.* 1996;42:1147-54.
96. World Anti-Doping Agency (WADA). The World Anti-Doping Code. International Standard for Laboratories. 2012 [Internet]. [Cited 2013 Dec 2]. Available from: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/ISL/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf.
97. Bidlingmaier M. Pitfalls of insulin-like growth factor I assays. *Horm Res.* 2009;71(1):30-3.
98. Miller WG, Erek A, Cunningham TD, Oladipo O, Scott MG, Johnson RE. Commutability limitations influence quality control results with different reagent lots. *Clin Chem.* 2011;57(1):76-83.

99. Erotokritou-Mulligan I, Eryl Bassett E, Cowan D, Bartlett C, Milward P, Sartorio A, Sonksen PH, Holt RI. The use of growth hormone (GH)-dependent markers in the detection of GH abuse in sport: Physiological intra-individual variation of IGF-I, type 3 pro-collagen (P-III-P) and the GH-2000 detection score. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(4): 520-6.
100. Holt RI, Erotokritou-Mulligan I, McHugh C, Bassett E, Bartlett C, Fityan A, Bacon J, Cowan D, Sonksen P. The GH-2004 project: the response of IGF-I and type III pro-collagen to the administration of exogenous growth hormone (GH) in non-Caucasian amateur athletes. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(1):45-54.
101. Guha N, Erotokritou-Mulligan I, Burford C, Strobridge G, Brigg J, Drake T, Bassett EE, Cowan D, Bartlett C, Sonksen PH, Holt RI. Serum insulin-like growth factor-I and pro-collagen type III N-terminal peptide in adolescent elite athletes: implications for the detection of growth hormone abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2969-76.
102. Tsitsimpikou C, Kouretas D, Tsarouhas K, Fitch K, Spandidos DA, Tsatsakis A. Applications and biomonitoring issues of recombinant erythropoietins for doping control. *Ther Drug Monit*. 2011;33(1):3-13.
103. Schumacher YO, Saugy M, Pottgiesser T, Robinson N. Detection of EPO doping and blood doping: the hematological module of Athlete Biological Passport. *Drug Test Anal*. 2012;4(11):846-53.
104. Jelkmann W, Lundby C. Blood doping and its detection. *Blood*. 2011;118(9):2395-404.
105. Lundby C, Robach P, Saltin B. The evolving science of detection of 'blood doping'. *Br J Pharmacol*. 2012;165(5):1306-15.
106. Lippi G, Franchini M, Salvagno GL, Guidi GC. Biochemistry, physiology, and complications of blood doping: facts and speculation. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43(4):349-91.
107. Reichel C. Recent developments in doping testing for erythropoietin. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(2):463-81.
108. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*. 2000;405(6787):635.
109. Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem*. 2002;311(2):119-6.
110. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document – TD2009 EPO. Harmonization of the method for the identification of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (i.e. darbepoetin and pegserpoetin). 2009 [Internet]. [Cited 2013 Nov 12]. Available from: http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/TD_EPO_2009.pdf.

111. Segura J, Pascual JA, Gutiérrez-Gallego R. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388(7):1521-9.
112. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document – TD2013EPO. Harmonization of analysis and reporting of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (i.g. darbepoetin, pegserpoetin, peginesatide, EPO-Fc) by electrophoretic techniques. 2013 [Internet]. [Cited 2013 Dec 5]. Available from: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA-TD2013EPO-Harmonization-Analysis-of-Recombinant-Erythropoietins-EN.pdf.
113. Stenman UH, Hotakainen K, Alfthan H. Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use. *Br J Pharmacol.* 2008;154(3):569-83.
114. Kicman AT, Brooks RV, Cowan DA. Human chorionic gonadotrophin and sport. *Br J Sports Med.* 1991;25(2):73-80.
115. Handelsman DJ, Goebel C, Idan A, Jimenez M, Trout G, Kazlauskas R. Effects of recombinant human LH and hCG on serum and urine LH and androgens in men. *Clin Endocrinol (Oxf.)*. 2009;71(3):417-28.
116. Strahm E, Marques-Vidal P, Pralong F, Dvorak J, Saugy M, Baume N. Influence of multiple injections of human chorionic gonadotropin (hCG) on urine and serum endogenous steroids concentrations. *Forensic Sci Int.* 2011;213(1-3):62-72.
117. Fischetto G, Berman S. From gene engineering to gene modulation and manipulation: can we prevent or detect gene doping in sport? *Sports Med.* 2013;43(10):965-77.
118. Van der Gronde T, de Hon O, Haisma HJ, Pieters T. Gene doping: an overview and current implications for athletes. *Br J Sports Med.* 2013;47(11):670-8.
119. Friedmann T, Rabin O, Frankel MS. Gene doping and sport. *Science.* 2010;327(5966):647-8.
120. World Anti-Doping Agency (WADA). The World Anti-Doping Code. The 2004 Prohibited List. International Standard.
121. Fallahi A, Ravasi A, Farhud D. Genetic doping and health damages. *Iran J Public Health.* 2011;40(1):1-14.
122. Gould D. Gene Doping: Gene delivery for Olympic victory. *Br J Clin Pharmacol.* 2012;76(2):292-8.
123. Battery L, Solomon A, Gould D. Gene doping: Olympic genes for Olympic dreams. *J R Soc Med.* 2011;104(12):494-500.
124. Oliveira RS, Collares TF, Smith KR, Collares TV, Seixas FK. The use of genes for performance enhancement: doping or therapy? *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(12):1194-1201.
125. McKanna TA, Toriello HV. Gene doping: the hype and the harm. *Pediatr Clin North Am.* 2010;57(3):719-27.

126. Thuyne WV, Eenoo PV, Delbeke FT. Nutritional supplements: prevalence of use and contamination with doping agents. *Nutrition Research Reviews*. 2006;19:147-58.
127. Pipe A, Ayotte C. Nutritional supplements and doping. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2002;12:245-9.
128. Brasil. RDC n. 18, 27 Apr 2010.
129. Sottas P, Robinson N, Rabin O, Saugy. The Athlete Biological Passport. *Clin Chem*. 2011;57(7):969-76.
130. Wozny M. The biological passport and doping in athletics. *Lancet*. 2010;376(9735):79.
131. Zorzoli M. The Athlete Biological Passport from the perspective of an anti-doping organization. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(9):1423-5.

PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DOS *LASERS* E SUAS APLICAÇÕES

Antônio L. B. Pinheiro
Paulo F. de Almeida
Luiz Guilherme P. Soares

23.1 INTRODUÇÃO

A luz, desde os primórdios da civilização, vem sendo utilizada com finalidades terapêuticas. O uso da helioterapia foi amplamente baseado em crenças religiosas e superstições. Os homens pré-históricos endeusaram o sol e consequentemente a luz solar, os quais foram considerados sagrados, sendo a eles atribuída a capacidade de afastar maus espíritos capazes de provocar doenças. Os deuses solares da Antiguidade eram considerados deuses da saúde e da cura.

Devido à baixa qualidade dos relatos referentes ao emprego da helioterapia, sua eficácia é de difícil julgamento. Contudo, dados vindos das literaturas grega e romana mencionam que essa modalidade terapêutica foi utilizada largamente no tratamento da epilepsia, artrite, asma e obesidade. Nessas culturas, o banho de sol era tido como uma atividade saudável e um método de medicina preventiva, como reconhecido por Heródoto no século VI a.C.

Simultaneamente à adoração das várias formas de agentes emissores de luz, esta foi utilizada pelos seres humanos de forma terapêutica e científica.

Cientistas renomados dedicaram seus estudos à luz, como sir Isaac Newton, a ponto de a física destinar um capítulo da sua área do saber aos estudos luminosos, a óptica. A óptica integrou o processo a partir do momento em que a luz passou a ser entendida como a própria natureza. A luz é um fenômeno essencial à vida do nosso planeta. Sobretudo, é ela que, quando provém do sol, e incidindo nas plantas, desencadeia o processo da fotossíntese. A planta não poderia viver sem luz; a vida animal não poderia existir sem a planta e, principalmente, sem a fotossíntese, que se opera na vegetação verde.

Compõe-se a luz de corpúsculos denominados fótons, os quais se propagam em ondas transversais. O fóton é uma partícula subatômica desprendida por átomos e dotada de alta energia luminosa, e diferenças de energia resultam em diferentes cores. A propagação da luz no vácuo é sempre igual, isto é, se processa sempre à mesma velocidade. A última medição da velocidade da luz, efetuada em 1956, foi de 299.792,4 Km/s.

Quando a luz atravessa substâncias materiais, seus raios sofrem ligeiro retardamento, de acordo com o meio e também o ângulo de saída. Por mais simples, as indagações da ciência pedem respostas difíceis e demoradas. Para a pergunta “o que é a luz?”, os cientistas tiveram que escrever grossos tratados, realizar inúmeras experiências e formular diferentes hipóteses.

A compreensão do fato de que nossas sensações visuais proviam da luz retida pelos corpos foi revolucionária e rendeu à óptica estudos mais detalhados de fenômenos considerados de origem divina. O eletromagnetismo e a mecânica quântica aliaram-se à óptica no subsídio à exploração da luz nas diversas áreas do conhecimento humano. Dentro da física, a óptica é um campo que lida não somente com a propagação da luz, mas também com a sua produção e, principalmente, com seus mecanismos de interação com a matéria.

Nos meios homogêneos e transparentes, a luz propaga-se em linha reta. A propagação é facilmente observada no nosso cotidiano, por exemplo: num feixe de luz proveniente de um holofote; em qualquer processo de alinhamento óptico; em mira para atirar em um alvo; na formação de sombras; na formação de imagens; entre outras situações. Em meios heterogêneos, a luz não se propaga necessariamente em linha reta. Como exemplos, temos a atmosfera terrestre, cuja densidade aumenta conforme decresce a altitude. Em consequência disso, os raios provenientes dos astros se encurvam ao se aproximarem da superfície terrestre, fenômeno conhecido como refração atmosférica. Esse fenômeno é conhecido como princípio da propagação retilínea da luz.

A propagação da luz independe da existência de outros raios luminosos na região que estes atravessam. Esse princípio pode ser observado quando

um palco é iluminado por dois feixes de luz provenientes de dois holofotes. A trajetória de um dos raios não é modificada pela presença do outro, ou seja, cada um segue sua própria trajetória, como se o outro não existisse. Esse aspecto é explicado pelo princípio da independência dos raios de luz.

Outro princípio é o da reversibilidade dos raios luminosos, no qual se considera que um raio faz um percurso qualquer tanto na reflexão quanto na refração. Se o raio de luz seguir o percurso no sentido contrário, a trajetória do raio será a mesma. Esse princípio também é conhecido como princípio do caminho inverso, que pode ser enunciado da seguinte forma: “A trajetória seguida pelo raio luminoso independe do sentido do percurso”.

No século XIX, vários métodos destinados a melhorar os resultados da fototerapia foram introduzidos, dentre os quais o uso de lentes para focalização da luz solar e o uso de caixas de vidros onde pacientes eram colocados para receberem os raios solares. Downes e Blunt demonstraram que algumas bactérias eram destruídas pela luz, sendo esse achado o precursor do uso das radiações ultravioletas (UV) para esterilização, tal qual usado nos dias atuais. Posteriormente, vários tipos de lâmpadas foram testadas como fontes de luz UV, e estas serviram de base para a actinoterapia, dissociando-se, assim, a fotomedicina da luz solar como fonte da radiação.

Como com quase tudo de importante que ocorreu na física no século XX, o personagem principal para a óptica foi Albert Einstein. Foi ele quem primeiro sugeriu que um feixe de luz não seria apenas uma onda eletromagnética, com suas características usuais de frequência, amplitude e fase. Para explicar certos fenômenos que atormentavam os físicos da época, como por exemplo o efeito fotoelétrico, Einstein propôs que a luz seria composta por entidades discretas (isto é, separadas e distintas entre si), com uma energia proporcional à frequência da onda luminosa: os fótons.

Como dita a óptica, a luz é uma onda. E os fótons? Os fótons são ambivalentes. Apresentam tanto características típicas de uma onda (frequência, amplitude, fase e polarização) como também de uma partícula (momento e localização espacial). Os físicos chamam isso de “dualidade onda-partícula” e garantem, com base na experiência, que essa dupla personalidade faz parte da natureza da luz.

A origem do *laser* é discutida. O primeiro *maser* (*microwave amplification by stimulated emission of radiation*) ou *laser* foi desenvolvido por Theodore Maiman em 1960, embora tenha sido Einstein, em 1916, quem propiciou o desenvolvimento teórico do *laser*, com a publicação de seu tratado *Zur Quantum Theorie der Strahlung*. Foram Schawlow e Townes os enunciadores dos princípios segundo os quais todos os *lasers* operam. Contudo, Townes,

Basov e Prokhorov receberam o prêmio Nobel em 1964, de modo que foi creditado a eles o desenvolvimento da teoria das emissões espontânea e estimulada de radiação.

Os princípios que regiam a física do *laser*, antes de 1916, restringiam-se aos princípios de interação da matéria até então conhecidos. A teoria da emissão estimulada proposta por Einstein baseou-se na teoria quântica proposta por Planck em 1900. Esta última discutiu as relações entre as quantidades de energia liberadas por processos atômicos.

O trabalho de Einstein, por sua vez, versou sobre a interação de átomos, íons e moléculas com a radiação eletromagnética em termos da absorção e emissão espontânea de radiação. Com a aplicação de princípios termodinâmicos, Einstein concluiu que o terceiro processo de interação, a emissão estimulada, deveria existir, e nela a radiação eletromagnética deveria ser produzida por um processo atômico. Contudo, outros autores atribuem ao físico americano Gordon Gold o desenvolvimento desse fantástico sistema de seleção de ondas, que permitiu a obtenção de um feixe de luz altamente concentrado.

O sistema foi batizado por Gold de *LASER*, abreviatura para a expressão inglesa *light amplification by stimulated emission of radiation* (ou, em português, amplificação de luz por emissão estimulada), que viria a propiciar ao mundo a abertura de novas fronteiras, revolucionando a ciência em diversos campos, desde a microcirurgia até a exploração espacial.

Embora tenha sido a proposição do terceiro princípio que levou Schawlow e Townes a descreverem os princípios do *maser*, foi Gordon Gold quem fez a primeira aplicação com sucesso da emissão estimulada de micro-ondas. Em 1960, Maiman conseguiu, pela primeira vez, a emissão estimulada de radiação. Esta estava localizada na faixa visível do espectro visual, e foi obtida pela excitação de uma roda de rubi (λ 694 nm) com pulsos luminosos intensos, resultando na geração do primeiro raio *laser* com emissão no espectro vermelho.

O *laser* é uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada, que, em contato com os diferentes tecidos, resulta, de acordo com o tipo do *laser*, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares. Sendo uma forma de energia não ionizante, ao contrário de outras formas de radiação usadas terapeuticamente, como, por exemplo os raios X, gama e de nêutrons, a radiação *laser* não é invasiva na grande maioria dos comprimentos de onda utilizados com finalidade terapêutica, sendo muito bem tolerada pelos tecidos.

23.2 LASER VERSUS LUZ

O fenômeno físico chamado luz é bastante conhecido de todos que gozam da propriedade de ver. São características primárias da luz a sua intensidade e a cor. A intensidade de um feixe luminoso está associada ao número de fótons por segundo que chegam a uma determinada área. O olho humano é capaz de detectar luz de intensidade de apenas uns poucos fótons por segundo focalizados através da íris. A mesma retina que detecta tal nível mínimo está capacitada a detectar intensidades da ordem de um trilhão de fótons por segundo sem danos permanentes.

A sensação de cor existe graças à capacidade que o olho humano tem de diferenciar fótons de diferentes energias. A região do vermelho (menor energia) sensibiliza pouco o olho humano, enquanto a região do verde é a que melhor o sensibiliza. Por outro lado, as frequências que correspondem ao ultravioleta e ao infravermelho não causam sensação de visão.

O raio *laser* é um raio de luz; portanto, caracteriza-se primariamente por cor e intensidade. O que faz o raio *laser* diferente da luz comum são certas propriedades inerentes a um fenômeno chamado amplificação de luz por emissão estimulada. Qualitativamente, podemos entender a física desse fenômeno através do modelo simplificado que se segue. Para tal, iniciamos recordando a mecânica da geração de luz comum por um sistema atômico ou molecular qualquer.

Um raio de luz, como o proveniente de uma lâmpada ou do sol, é o resultado de várias transições eletrônicas espontâneas de níveis de energia previamente excitados para níveis de energia mais baixos. Esses níveis representam estados energéticos permitidos de um sistema atômico ou molecular qualquer e são quantizados. Por tratar-se de processo espontâneo, cada transição ocorre sem nenhuma correlação com as demais e, como resultado, temos milhões de “trens de onda” de cerca de um metro de comprimento, viajando com altíssima velocidade em todas as direções e sem qualquer relação de fase.

Quando um elétron é promovido para um estado excitado, ele tende a permanecer em tal estado por um tempo médio que é característico do sistema ao qual pertence. A volta desse elétron para o estado fundamental é, portanto, imprevisível, e no máximo podemos afirmar que a emissão de fótons, decorrente de tal volta para o estado fundamental, ocorrerá preferencialmente dentro de um tempo médio característico do sistema. A este fenômeno chamamos “emissão espontânea”.

Já o raio *laser* é ordenado, isto é, as emissões provenientes de cada átomo são forçadas a ocorrer em uma única direção, e, além disto, em instantes de tempo determinados pela “ordem” externa, configurando uma “emissão estimulada”. É possível ter uma visão leiga desse fenômeno acreditando na seguinte assertiva: “Um átomo excitado poderá emitir radiação antecipadamente caso um fóton, proveniente de outro átomo semelhante, passe por ele. A emissão dar-se-á durante tal passagem, e o novo trem de onda incorporar-se-á ao trem de onda excitador, aumentando seu comprimento e aumentando sua amplitude na região em que os dois coincidirem”.

Agora que já sabemos da existência de um tipo menos comum de emissão de radiação, ou seja, a estimulada, podemos falar sobre as propriedades particulares do *laser*, entendendo, então, a sua origem.

A primeira aplicação do *laser* em medicina foi uma mera substituição de equipamentos básicos em uma técnica já conhecida da oftalmologia – a fotocoagulação. A substituição da lâmpada de xenônio por um *laser* trouxe fabulosos benefícios para os tratamentos de fundo de olho, graças, principalmente, ao que chamaremos de “primeira propriedade do *laser*”, que é a alta colimação de seu feixe.

A “segunda propriedade particular” dos *lasers* refere-se à sua possibilidade de fornecer altas densidades de potências de radiação, o que não deixa de ser, também, uma consequência direta da colimação. Em princípio, se arranjarmos um número muito grande de átomos, teremos no final do percurso um pulso de luz muito intenso, e, se tivermos uma maneira de transferir energia continuamente para os átomos, fazendo-os voltar sempre para o estado excitado, teremos a manutenção dos pulsos colimados, ou seja, teremos uma fonte contínua de luz de potência elevada que pode ser focalizada em área diminuta.

A energia (E) eletromagnética é normalmente medida em joules (1 joule equivale a 0,24 calorias), enquanto a potência (P) é medida em Watts. Uma potência de 1 Watt significa que a fonte está emitindo 1 Joule em cada segundo, ou seja:

$$\text{(Equação 23.1)} \quad 1 \text{ Watt} = 1 \text{ Joule} / 1 \text{ segundo} = \text{Joule} / \text{s}$$

Portanto:

$$\text{(Equação 23.2)} \quad P = E / t$$

em que t é o tempo gasto para transferir a energia E . Já densidade de potência, cuja unidade é Watt/m^2 , por definição, depende da área (A) que recebe a energia radiante, sendo expressa da seguinte maneira:

$$\text{(Equação 23.3)} \quad D \text{ (densidade de potência)} = P/A$$

A “terceira propriedade particular” da luz *laser* é a monocromaticidade, ou melhor, o alto grau de monocromaticidade da radiação. Essa propriedade decorre do fato de a radiação *laser* ser produzida por um conjunto de centros idênticos que participam sempre com a mesma transição eletrônica, emitindo fótons iguais. Casos específicos existem, também, em que um determinado equipamento *laser* pode emitir diferentes feixes *laser*, cada um com sua cor definida. É importante observar que apenas enumeramos as leis por motivos didáticos, pois sua ordem é irrelevante.

23.3 FOTOTERAPIA: UM PANORAMA DAS APLICAÇÕES DA LUZ EM DIVERSOS PROCESSOS BIOLÓGICOS

A biotecnologia se aprimora a cada avanço em suas plataformas associadas à inovação nos processos biológicos. A biotecnologia industrial engloba diversos setores: alimentício, farmacêutico, cosmético, agricultura, na saúde de forma geral, dentre outros. A utilização da luz como ferramenta terapêutica para inúmeras doenças vem ganhando espaço na biotecnologia industrial, não apenas na área médica e estética, mas também no melhoramento de métodos eficientes de detecção de micro-organismos patógenos ou não, por exemplo. Os estudos relacionados à fototerapia nesse campo do conhecimento ainda são incipientes.

Uma técnica muito comum para verificar células sanguíneas é a microdissecação. Estudo de Fink (2003)⁴⁰ demonstrou que essa técnica aliada à manipulação assistida por *laser* mostrou-se eficiente na acurácia para detectar células sanguíneas, as quais poderiam ser plaquetas ou não. Para a contagem de células sanguíneas, os analisadores automatizados passaram por avanços, os quais determinam hoje com maior eficiência a diferenciação dessas células, a partir da propriedade de dispersão da luz, a absorbância. Atualmente, os analisadores incluíram a citometria de fluxo fluorescente, que fornece a contagem diferencial através do *laser*.

Estudos iniciais sobre biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos foram realizados a fim de analisar o processo de biodegradação

desses compostos por micro-organismos, utilizando para quantificar a liberação de gás carbônico (CO_2) a metodologia da absorção na luz infravermelha. Dessa forma, é possível analisar e verificar que determinados micro-organismos promovem alterações metabólicas diferentes quando crescem sobre o petróleo, através da luminescência induzida a *laser*.

A aplicação do *laser* já foi efetuada para aprimorar a técnica de diagnóstico conhecida como amplificação fágica para detecção de micro-organismos em amostras de alimentos. O princípio da técnica envolve a utilização de milhões de partículas fágicas sobre uma amostra, de modo que se os micro-organismos estiverem presentes na amostra, os fagos infectarão as células específicas e as partículas fágicas excedentes serão neutralizadas por aplicação de *laser* e uma substância fotossensibilizadora. Dessa forma, transferindo-se a amostra contendo os micro-organismos infectados para um meio em placa com culturas reveladoras, ocorrerá a formação de placas de lise, as quais podem ser quantificadas, de modo a representar a quantidade de micro-organismos presentes na amostra original. O tipo de *laser* e fotossensibilizador devem ser selecionados para não afetar as células a serem detectadas e os micro-organismos reveladores⁹¹; isto é, somente podem afetar os vírus que estiverem livres.

A utilização da luz *laser* em métodos de detecção de organismos como bactérias e leveduras vem ocorrendo em diversas pesquisas. Para detectar micro-organismos deteriorantes da cerveja, por exemplo, destaca-se a citometria de fluxo, que utiliza tecnologia a *laser* e métodos de coloração para a detecção de micro-organismos em líquidos escoando através de um pequeno orifício. O uso do equipamento que detecta com maior sensibilidade o CO_2 pode auxiliar no entendimento dos processos metabólicos realizados pelos micro-organismos na biorremediação e biodegradação de substâncias dispersas no solo.

A tecnologia *laser* vem sendo largamente utilizada em experimentos com materiais biológicos, com o objetivo de averiguar a possibilidade de utilização desse equipamento para análises nos setores de agricultura, veterinária e alimentos, através da análise das imagens geradas pelo *laser*. Oliveira¹¹⁷ pesquisou a viabilidade de sementes, umidade do solo, umidade de sementes, análise da qualidade de sêmen animal, entre outras, buscando inserir a técnica *laser* em pesquisas relativas às ciências agrárias, devido ao seu potencial na detecção de diferenças na atividade biológica dos materiais.

O avanço nas técnicas laboratoriais em análises clínicas é de grande necessidade, uma vez que permitirá a minimização de alíquota coletada, com os riscos biológicos ocupacionais, minimização de custos de análise,

conscientização ambiental e rapidez e precisão analítica. Em estudo recente²⁵, foi observado que o uso de tecnologias limpas de análise, como a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy* – FT-IR), associada aos métodos de análise multivariada, é capaz de detectar alguns fungos como a *Candida sp.* a partir de pouca biomassa.

As técnicas de microscopias confocal de varredura a *laser* (do inglês, *confocal laser scanning microscopy* – CLSM) e de imagem da vida de fluorescência (do inglês, *fluorescence lifetime imaging microscopy* – FLIM) são capazes de fornecer informações importantes sobre a concentração e a distribuição espacial de um fluoróforo dentro de uma amostra, uma vez que essa molécula tem um tempo de decaimento da fluorescência característica que varia em função dos microambientes. Ao aplicar essas técnicas sobre biomassa pode-se, por exemplo, investigar a degradação de lignina e celulose. Essa aplicação será de grande importância para o desenvolvimento de métodos úteis às biorrefinarias para a geração de diversas substâncias químicas e biocombustíveis, bem como para a busca de fontes que substituam o petróleo na indústria petroquímica.

Ainda sobre o processo de detecção de micro-organismos, o uso da luz *laser* tem ganhado destaque nas análises de estrutura e mensuração de aglomerados celulares, como visto no trabalho de Ronnest e colaboradores¹⁵⁰, que demonstra a importância da difração *laser* como instrumento de comparação com a análise de imagem de grupos celulares de *Streptomyces coelicor*.

O avanço tecnológico dos aparelhos de microscopia eletrônica trouxe maior acurácia na identificação de estruturas em dimensão molecular. Uma técnica que utiliza a luz monocromática e tem ganhado espaço em estudos de verificação de estruturas químicas e moleculares é a espectroscopia Raman. Algumas pesquisas demonstram que essa é uma das técnicas eficientes de análises de biomateriais como ossos, por exemplo. Jabłoński⁷² verificaram ossos de ratos que haviam recebido estrôncio, para tratamento da osteoporose, de modo que essa substância poderia estar presente em diferentes formas químicas. O estudo foi realizado com o auxílio de outras técnicas de análise.

A detecção de compostos tóxicos em resíduos industriais torna-se cada vez mais importante, a fim de evitar o acúmulo de metais pesados, por exemplo, e outros compostos nocivos a micro-organismos de interesse industrial (algas). A espectroscopia induzida por *laser* vem sendo utilizada com o objetivo de aumentar a sensibilidade e seletividade em águas residuais industriais, para o controle de íons metálicos. Essa característica da técnica

poderá se estender à monitorização da produção em massa de biocombustíveis comerciais e à indústria alimentícia.

A investigação em biotecnologia constitui um campo bastante amplo para acompanhar as possibilidades oferecidas pela aplicação da tecnologia fotônica, combinando diversas áreas técnicas, incluindo fontes e sensores de luz, bem como tecnologia de bioensaios.

Na biotecnologia industrial, a ação do *laser* pode ser descrita através da produção de metabólitos secundários de fungos. Siqueira¹⁶³ observara a ação de um *laser* de baixa intensidade na produção de compostos de um dermatófito *Trichophyton rubrum*, fungo causador de dermatomicoses. A partir desse estudo, notou-se a importância do *laser* GaAlAs. Este apresentou efeitos no metabolismo celular e alteração de morfologia e da taxa de crescimento da colônia *in vitro*.

23.4 FOTOTERAPIA: UM PANORAMA DAS APLICAÇÕES DA LUZ NA SAÚDE

A luz vem sendo utilizada com finalidades terapêuticas há muito tempo, desde os primórdios. Relatos de 1400 a.C relevam o uso de combinações de plantas e luz solar para o tratamento de doenças como vitiligo e psoríase. Em razão da evolução de conceitos e teorias a respeito da luz, que passa por cientistas renomados como Hertz em 1887, Planck em 1890 e Einstein em 1905, estudos cada vez mais específicos vêm sendo realizados com o auxílio da luz.

Atualmente, a fototerapia monocromática (*laser* e LED) tem sido empregada nos tratamentos de icterícia, em reparo e cicatrização de lesões como mucosite e herpes; em articulações, como nas disfunções temporomandibulares (DTM) e nevralgias; na estética, através da remoção de tatuagens e na luta contra o envelhecimento. Recentemente, uma nova modalidade vem surgindo: a terapia fotodinâmica (TFD), que utiliza corantes fotossensíveis com o objetivo de atingir determinadas células-alvo, de modo a eliminá-las, podendo ser utilizada no tratamento do câncer ou contra micro-organismos.

23.4.1 Fotobiomodulação *laser*

A absorção da luz *laser* pelos tecidos pode resultar em quatro processos: fotoquímico, fototérmico, fotomecânico e fotoelétrico. Por causa do grande número de efeitos clínicos que esses processos ocasionam, eles podem ser

subdivididos de acordo com a sua manifestação clínica. No grupo dos efeitos fotoquímicos podemos incluir a biomodulação, que é o efeito da luz *laser* sobre processos moleculares e bioquímicos que normalmente ocorrem nos tecidos, como, por exemplo, a cicatrização de feridas e o reparo ósseo¹²⁸.

A fototerapia *laser* possui uma capacidade, dependente do comprimento de onda, de alterar o comportamento celular na ausência de aquecimento significativo. A dispersão da luz *laser* no tecido é muito complexa, pois os componentes do tecido influenciam a dispersão da luz. Os efeitos da fototerapia *laser* nos ossos ainda são controversos, com estudos anteriores mostrando resultados diferentes ou conflitantes. É possível que o efeito da fototerapia *laser* sobre a regeneração óssea dependa não só da dose total de irradiação, mas também do tempo e modo de irradiação¹⁰¹.

Foi demonstrado em vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, que a fotobiomodulação *laser* (FBML) no nível celular estimula o fotorreceptor citocromo-C-oxidase, resultando no aumento do metabolismo e produção de energia, consequentemente aumentando o metabolismo oxidativo mitocondrial e iniciando uma cascata de reações celulares que modulam o comportamento biológico, a angiogênese, macrófagos e linfócitos; a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno; a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, entre outros, acelerando, assim, o processo de reparação óssea¹⁴¹.

No reparo ósseo, estudos demonstraram que a fototerapia *laser* na faixa do infravermelho próximo (FTL-IVP) é a mais adequada, devido à sua maior profundidade de penetração no tecido, quando comparada com a fototerapia *laser* emitida no espectro visível da luz. Seus resultados indicam que a área óssea irradiada com FTL-IVP apresenta proliferação dos osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea. Sabe-se que esse efeito estimulador sobre os ossos ocorre durante a fase inicial da proliferação de fibroblastos e osteoblastos, bem como durante a fase inicial de diferenciação de células mesenquimais. A proliferação fibroblástica e o aumento de sua atividade foram observados previamente em indivíduos irradiados e culturas de células, sendo este o fator responsável pela grande concentração de fibras de colágeno vistas dentro do osso irradiado^{53-56,138-140}.

23.4.2 Fotobiomodulação LED

A terapia com luz é um dos métodos terapêuticos mais antigos utilizados pelos humanos. O uso dos LEDs como fontes de luz viria a ser o próximo passo no desenvolvimento tecnológico da terapia com luz⁸⁰.

LED é a sigla, em inglês, para *light emitting diode*, que em português significa diodo emissor de luz. Esse tipo de emissão é diferente dos *lasers*, que produzem emissão estimulada e amplificada de radiação. Inicialmente, se atribuía os efeitos do *laser* à coerência, mas foi mostrado que fontes não coerentes como os LEDs também alcançavam bons resultados⁸¹.

O uso da fototerapia LED cresceu após resultados positivos demonstrados pela fototerapia *laser* na melhora do reparo ósseo em vários modelos^{109,112,113}, porém ainda há poucos relatos sobre o uso da fototerapia LED nesse processo, principalmente quando da sua associação aos biomateriais. Experimentos em dimensão celular evidenciaram que tanto a luz coerente como a não coerente, nos mesmos comprimentos de onda, intensidade e tempo de irradiação, promovem efeitos biológicos semelhantes^{83,84}. O sucesso do uso do LED em várias áreas confirma essa afirmação^{17,19}.

O aumento na deposição de colágeno após a irradiação com LED foi documentado em culturas de fibroblastos e em modelos humanos nos quais foi observada também a diminuição da collagenase¹⁹ na cicatrização tecidual em modelos de queimadura de terceiro grau cicatrizantes e em lesões bolhosas humanas¹⁸. Há evidências de que a luz produzida por LEDs, nos mesmos comprimentos de ondas bioestimulatórios de estudos anteriores com o *laser*, tem efeitos bioquímicos similares.

Estudos recentes mostram que a fototerapia LED induz um processo de reparo mais rápido, com presença de osso neoformado de boa qualidade. Essas características são observadas em diversos estudos nos quais foi utilizada a fototerapia *laser* com parâmetros semelhantes. Parece provável que os efeitos benéficos do LED são similares àqueles do *laser*. É possível que o mecanismo envolvido seja similar, com a absorção da luz pelo citocromo-C-oxidase presente na membrana mitocondrial. Apesar do crescimento das aplicações bem-sucedidas da fototerapia LED em diversas áreas, seu uso no reparo ósseo e associado a enxerto de biomateriais precisa ser mais estudado^{109,112,113}.

A fototerapia na icterícia consiste na colocação do neonato sob uma fonte de luz fluorescente. A luz absorvida degrada a bilirrubina impregnada na pele, transformando-a em derivados hidrossolúveis que serão eliminados. A eficácia desse tratamento depende da intensidade da luz emitida pelos aparelhos, de ter espectro de emissão próximo ao da absorção da bilirrubina, da idade pós-natal do recém-nascido (RN), da idade gestacional, do peso de nascimento, da causa da icterícia e do valor de bilirrubinemia no início do tratamento.

De acordo com os resultados de Leal e colegas⁸⁷, a terapia com *laser* HeNe apresentou boa resposta em relação ao reparo tecidual. Ainda nesse estudo, os efeitos biológicos do *laser* de baixa potência têm sua função baseada em um processo fotobiológico, que consiste na absorção molecular de energia luminosa depositada e transformada em energia vital. A literatura pertinente ao tema reparo tecidual e os experimentos realizados por Lins e colegas⁹² parecem indicar claramente a ocorrência de múltiplos efeitos bioestimulantes mediados pelo *laser*, inclusive eventos celulares (proliferação epitelial, endotelial e fibroblástica, elevada síntese colagênica, diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, movimentação celular dos leucócitos, fibroblastos e células epiteliais e aumento da atividade fagocitária dos macrófagos) e vasculares (angiogênese e vasodilatação), que desempenham importante papel na aceleração do processo de reparo de tecidos injuriados.

Os resultados obtidos por Minatel e colaboradores¹⁰⁴ corroboram as evidências de que a fototerapia por meio de LEDs a λ 600 nm a 1.000 nm promove o reparo tecidual. Ainda sobre LED e reparo tecidual, Meyer e colegas¹⁰³ concluíram que o emprego da fototerapia não colimada verde (λ 515 nm a 525 nm) e vermelha (λ 620 nm a 630 nm), durante seis minutos, produziu resultados qualitativos na formação da cicatriz de segunda intenção (que ocorre quando uma ferida apresenta as margens afastadas e forma-se um grande coágulo). Entretanto, faz-se necessária a realização de mais pesquisas que utilizem o LED em comprimentos de onda fora do espectro vermelho e infravermelho³².

A deficiência de ferro (anemia) prejudica a formação da hemoglobina, bem como o transporte de oxigênio. O processo de cicatrização envolve inúmeras funções, muitas das quais são dependentes da presença de oxigênio. Com base nos resultados de Sampaio e colaboradores¹⁵⁵, o *laser* melhora a angiogênese, aumenta o suprimento de sangue, a proliferação e a função de células. Além disso, concluíram que a utilização de luz LED λ 700 \pm 20 nm causou um significativo impacto positivo de biomodulação da proliferação de fibroblastos sobre animais anêmicos, e a irradiação com *laser* (λ 660 nm) foi mais eficaz em aumentar a proliferação em animais não anêmicos.

De acordo com sua pesquisa realizada em ratos albinos, machos e idosos, Couto²⁹ verificou que o tratamento com a luz coerente e não coerente favorecem o processo de reparo epitelial, sendo que os animais tratados com a luz não coerente (LED) no comprimento de onda do λ 640 \pm 20 nm apresentaram melhores resultados quando comparados com a luz coerente (*laser*) no comprimento de onda λ 660 nm.

A mucosite oral (MO), uma lesão que ocorre na superfície da mucosa oral, é muito desconfortável, passível de sofrer infecções secundárias e comprometer o estado de saúde geral do indivíduo⁴⁸. Afeta, principalmente, pacientes com câncer e os que são submetidos a transplantes, devido às altas doses de quimioterapia e/ou radioterapia⁶⁶. A prevenção e o tratamento da mucosite oral têm sido empírica e amplamente afetadas pela higiene oral, por medicações como analgésicos, antibióticos e anti-inflamatórios e pelo próprio sistema imunológico do paciente. A terapia com *laser* de baixa intensidade produz cicatrização de feridas, e o uso profilático desse tratamento parece reduzir a incidência de lesões severas de MO^{66,71}.

No trabalho de Volpato¹⁸³, houve uma baixa na incidência da mucosite oral, independentemente da fonte de luz utilizada. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados com *laser* e LED sobre a incidência e severidade da mucosite oral, utilizando o mesmo protocolo em ambos os casos.

O herpes simples é uma infecção ulcerativa mucocutânea de característica crônica, que pode ser recorrente e que tem como agente etiológico duas cepas do vírus herpes simples (HSV). O herpes labial é de interesse estomatológico porque representa uma das viroses que mais frequentemente acomete a cavidade bucal. O uso de antivirais tópicos ou sistêmicos ainda é amplamente recomendado para o tratamento das lesões; entretanto, tem-se observado a emergência de estirpes resistentes a alguns antivirais. O *laser* terapêutico de baixa intensidade e potência atuam como anti-inflamatório e analgésico, que, somados ao seu poder bioestimulante, diminui o desconforto logo após a primeira aplicação e acelera a reparação, promovendo bem-estar e melhora na qualidade de vida desses pacientes.

Park e colegas¹²⁰ realizaram uma pesquisa em 28 pacientes com herpes-zóster, uma doença provocada por uma variante do herpes-vírus, que causa lesões cutâneas e dor intensa. Nesse estudo, pode-se observar que o grupo de pacientes tratados com fototerapia LED alcançou uma cicatrização mais rápida do que o grupo controle. Também foi constatada a redução da dor, provavelmente devido ao efeito anti-inflamatório atribuído ao LED.

Segundo a Academia Americana de Dor Orofacial, a disfunção temporomandibular (DTM) é definida como um conjunto de distúrbios que envolvem os músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular (ATM) e estruturas associadas. Dentre os sintomas, os mais relatados são dores na face, na articulação temporomandibular (ATM) e/ou nos músculos mastigatórios, dores na cabeça e na orelha, além de zumbido, plenitude auricular e vertigem.

Baseado no estudo de Frare e Nicolau⁴⁹, 20 pacientes com DTM foram selecionados e submetidos à fototerapia utilizando o *laser* de baixa potência de arseniato de gálio (λ 904 nm). Pode-se concluir que a fotobiomodulação do *laser* promove resultados satisfatórios no controle do quadro doloroso de pacientes com DTM, podendo ser indicada como método eficaz e não invasivo. Outros autores corroboram estes resultados, ressaltando o alívio da dor e o restabelecimento da função promovidos pela fototerapia^{8,129}. Porém, os autores sugerem que novos estudos sejam realizados, principalmente para o esclarecimento do protocolo terapêutico.

A síndrome da fibromialgia caracteriza-se por rigidez e dores no sistema musculoesquelético de intensidade variada e difusa, com múltiplos pontos dolorosos. A etiologia ainda é desconhecida; a condição parece ser uma forma de reumatismo crônico, mas não inflamatório. Carvalho e colegas²³ realizaram uma pesquisa na qual quatro pacientes com diagnóstico firmado de fibromialgia foram submetidos a duas aplicações de LED por semana, nas regiões dolorosas e no ponto de acupuntura C7, durante quatro semanas, totalizando oito sessões. Todos os pacientes apresentaram diminuição da dor após as aplicações do LED, com redução das regiões dolorosas.

De acordo com a Associação Internacional de Estudo da Dor, a nevralgia do trigêmeo é uma neuropatia definida como uma dor facial crônica, de curta duração, lancinante, recorrente, geralmente unilateral, devido a uma desordem do quinto nervo craniano. Causa episódios de dor intensa nos olhos, lábios, nariz, cabeça e mandíbula. Devido à presença de muitos pacientes com resistência à intervenção farmacológica, algumas opções não medicamentosas têm sido estudadas. O *laser* terapêutico pode ser utilizado em vários procedimentos clínicos para tratamento da dor e mediação dos processos inflamatórios com cura acelerada, sendo uma modalidade altamente eficaz no tratamento da dor facial intratável, assim como na nevralgia trigeminal.

A terapia a *laser* ganhou muita popularidade no tratamento de lesões pigmentadas da pele e tatuagens. Ela trabalha com o princípio da fototermólise seletiva, gerando pulsos ultracurtos de alta energia e potência, com um efeito fotoacústico adicional. O comprimento de onda de λ 1064 nm é seletivamente absorvido pelos cromóforos, tais como partículas de tinta e melanina.

O envelhecimento cronológico ou intrínseco é determinado geneticamente; e o envelhecimento extrínseco, também chamado fotoenvelhecimento, ocorre por exposição à radiação ultravioleta. Patriota e colegas¹²¹ realizaram uma pesquisa com 26 mulheres, com idades entre 40 e 65 anos,

submetidas à aplicação da luz intensa pulsada. Concluíram que a luz intensa pulsada constitui boa opção de tratamento para o fotoenvelhecimento cutâneo, sendo uma técnica não ablativa, segura e eficaz.

O uso da fototerapia terapêutica como uma modalidade na dermatologia é uma boa opção hoje em dia. Através de um estudo da prevalência das dermatoses encaminhado à unidade de fototerapia, Casara e colegas²⁴ comprovaram a importância de avaliar a relevância da manutenção e atualização dessa modalidade terapêutica.

Na dermatologia pode-se classificar os *lasers*, de acordo com as suas funções e aplicações clínicas, em:

- 1) *Lasers* de corte e de vaporização.
- 2) *Lasers* vasculares.
- 3) *Lasers* pigmentares.
- 4) *Lasers* depilatórios.
- 5) *Lasers* de rejuvenescimento não ablativo.

Têm diversas indicações, tais como em angiomas e hemangiomas, verrugas virais, remoção de tatuagens, na acne, na medicina estética com o rejuvenescimento e, mais recentemente, na terapia fotodinâmica.

Através de um ensaio clínico, 10 mulheres entre 48 a 65 anos de idade (média de 57,5 anos) foram selecionadas e submetidas a 20 sessões de LED, duas sessões por semana, com luz vermelha λ 630 nm por 30 minutos. Concluiu-se que o tratamento com LED para o rejuvenescimento foi bastante eficiente em relação ao grau de melhora.

Vale ressaltar que os resultados obtidos com a laserterapia para prevenir e/ou melhorar as rugas não podem ser comparados com resultados de cirurgias plásticas ou outros métodos curativos. A utilização desse *laser* de CO₂ (não abrasivo/não invasivo) corresponde à realização de um *peeling* térmico, no qual a luz emitida agirá de maneira mais efetiva depois da segunda sessão, pois só assim ele terá capacidade de penetrar profundamente, tornando-se cada vez mais eficaz quanto à melhoria do aspecto cutâneo.

23.5 LASERTERAPIA NOS PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO E REPARO

O limiar de sobrevivência da célula depende do tecido em que está localizada e do seu estado fisiológico. O *laser* de baixa intensidade tem a

propriedade de estimular a membrana plasmática e as membranas mitocondriais, induzindo a célula à biomodulação, ou seja, estimulando o estado de normalização da região afetada. Esse tipo de terapia passou a ser chamado de laserterapia. Quando a laserterapia é usada no espectro eletromagnético visível, existe uma fotobioestimulação inicial na mitocôndria, a qual ativa uma cadeia de eventos biológicos. Quando a irradiação ocorre no espectro infravermelho, há estímulo dos canais da membrana plasmática, resultando em mudanças na permeabilidade da membrana, temperatura e gradiente de pressão. Tanto a luz visível quanto a infravermelha podem ser absorvidas por diferentes componentes da cadeia respiratória celular, como os cromóforos na citocromo-C-oxidase ou porfirinas, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio ou radicais superóxido.

A radiação emitida pelos *lasers* em baixa potência tem demonstrado efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes, sendo, por isso, bastante utilizada no processo de reparo tecidual. São observados os efeitos terapêuticos de morfodiferenciação e proliferação celular, neoformação tecidual, revascularização, redução do edema, maior regeneração celular, aumento da microcirculação local e permeabilidade vascular. Portanto, a terapia a *laser* apresenta-se como uma alternativa para processos que apresentem reação inflamatória, dor e necessidade de regeneração tecidual.

O processo de reparo constitui uma reação tecidual dinâmica, que abarca os seguintes fenômenos: inflamação, proliferação celular e síntese de elementos constituintes da matriz extracelular, incluindo as fibras colágenas, elásticas e reticulares. A absorção molecular da luz *laser* permite um aumento do metabolismo celular, caracterizado pela estimulação de fotorreceptores na cadeia respiratória mitocondrial, alterações nos níveis de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno. A aceleração da microcirculação resulta em alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de metabólitos intermediários.

23.5.1 Reparação tecidual tendínea

O tecido tendíneo, classificado como tecido conjuntivo denso, é a interface entre o tecido contrátil e o não contrátil e tem como função transmitir a força produzida pelo músculo para o osso, tornando possível o movimento articular^{6,124}.

O tendão é constituído por células (fibroblastos) e matriz extracelular, na qual estão imersas proteínas fibrosas de colágeno e elastina, proteoglicanas,

glicoproteínas e mucopolissacarídeos. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, compreendendo cerca de 90% do peso úmido do tendão. Os tendões consistem em feixes paralelos de fibras colágenas firmemente agrupadas, tendo entre elas fileiras de fibroblastos formando um tecido denso e modelado, orientando as fibras do tendão e tornando-o resistente a uma resposta tensora. Os feixes de colágeno do tendão, denominados feixes primários, se agrupam com feixes menores, denominados feixes secundários, onde são envolvidos por tecido conjuntivo frouxo contendo poucos vasos sanguíneos e nervos, que dão suprimento aos tendões. Por haver baixa vascularização, oxigenação e nutrição, o tendão possui baixa capacidade de regeneração.

Lesões do tecido conjuntivo, como ruptura do tendão e tensões ligamentares, são comuns, principalmente entre atletas. Ao contrário da maioria dos tecidos moles, cujo tempo de reparo dura em média de sete a dez dias, os tendões necessitam de pelo menos seis semanas. Essas lesões são causa de preocupação para os cirurgiões que irão reconstruí-los, pois a sutura de um tendão é uma das mais decepcionantes intervenções cirúrgicas, devido à formação frequente de aderências nesse tipo de tecido, impedindo que o tendão recupere sua função. Durante esse período, geralmente o paciente é imobilizado para evitar rupturas, o que causa inúmeras complicações funcionais, retardando o processo de reabilitação. Portanto, torna-se necessária a elaboração de estudos com o objetivo de melhorar o reparo tendíneo, reduzindo o tempo de recuperação, de imobilização e o retorno às atividades rotineiras.

Arruda e colaboradores⁶ estudaram a influência da terapia *laser* de baixa intensidade na organização das fibras de colágeno durante o reparo do tendão calcâneo de ratos. Para isso, os autores utilizaram 37 ratas da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com cinco semanas de idade, como cobaias. A lesão foi realizada, após anestesia, no terço médio do tendão calcâneo, onde foi feita a tenotomia total por cisalhamento transversal. Para tratamento da lesão, foram utilizadas duas fontes de luz nos seguintes parâmetros: um diodo GaAs, com comprimento de onda λ 904 nm e potência de pico de 15 W, pulsado na frequência de 2000 Hz, dose de 3 J/cm², diâmetro do feixe de 0,07 cm², duração de pulso de 180 ns, resultando em um tempo de aplicação de 9 segundos; e um diodo de AlGaInP com λ 670 nm e potência de 30 mW, contínuo, dose de 3 J/cm², área do feixe de 0,02 cm² resultando em um tempo de aplicação de 6 segundos.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: grupo GA (n = 8): submetido à irradiação pelo *laser* infravermelho (GaAs); grupo GB (n = 8): submetido à irradiação *laser* vermelho (AlGaInP); grupo

GAB ($n = 8$): irradiação com a associação dos dois tipos de *laser*, resultando em um tempo de aplicação total de 15 segundos; grupo GP ($n = 7$): controle sem lesão e não tratado; grupo GCL ($n = 6$): lesado e submetido a um tratamento placebo.

A terapia *laser* teve início 24 horas após a tenotomia e constou de 12 sessões consecutivas e ininterruptas, realizadas por meio da técnica de contato, num ângulo de 90° em relação à superfície da área lesada. Dois dias após a última sessão, os animais sofreram eutanásia e seus tendões foram retirados para análise da birrefringência. Os melhores resultados foram obtidos no grupo GAB, tratado com a associação dos dois tipos de *laser*, o que permite inferir uma sinergia de ação dos *lasers* vermelho e infravermelho próximos no reparo do tecido conjuntivo no tendão de ratos.

Em outro estudo recente, publicado em 2005 por Salate et al.¹⁵³, cujo objetivo era analisar o efeito de diferentes irradiâncias na angiogênese, um componente essencial do tecido de reparação, em rupturas parciais de tendão de Aquiles de ratos, um total de 96 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) foram utilizados. As cobaias foram igualmente subdivididas em grupos submetidos ao tratamento com *laser* em três, cinco e sete dias ou para tratamento placebo em três, cinco e sete dias pós-lesão, começando no mesmo dia da ruptura. Para a indução da lesão, os autores utilizaram um método distinto do utilizado no artigo anterior. O membro posterior direito foi colocado em tração, e o tendão de Aquiles foi posicionado no equipamento para fazer uma lesão parcial. Um peso de 186 g colocado 20 cm acima do animal caiu sobre o tendão numa energia potencial de queda de 364,9 mJ.

O tendão lesionado do grupo teste foi tratado em um único ponto com *laser* contínuo de InGaAlP, que emite luz com λ 660 nm de comprimento de onda, por um período de 10 segundos. Um dos grupos teste (24 animais) recebeu 10 mW de potência de saída, com uma dose de $2,5 \text{ J/cm}^2$ todos os dias, no mesmo período, durante três ($n = 8$), cinco ($n = 8$) e sete dias ($n = 8$) a partir do mesmo dia da lesão, cerca de seis horas depois. No segundo grupo teste (24 animais), a potência e a dose variaram e os outros parâmetros foram mantidos: 40 mW de potência de saída, com uma dose de 10 J/cm^2 . Um grupo controle ($n = 24$) foi submetido a tratamento placebo, e o outro ($n = 24$) foi mantido nas suas respectivas gaiolas durante três ($n = 8$), cinco ($n = 8$) e sete dias ($n = 8$), sem qualquer intervenção.

Passadas 24 horas após o último tratamento, os animais foram sacrificados e os respectivos tecidos tendíneos foram analisados por meio da técnica histológica. Um total de cinco áreas de igual tamanho foi determinado, e

o número de vasos foi contado nessas áreas por um sistema de medição de vídeo. Os resultados indicam que o número de vasos estava acentuadamente aumentado em ratos tratados com *laser* em comparação com os dois grupos controle. O estudo mostrou que o *laser* de baixa intensidade de λ 660 nm foi eficiente no aumento da angiogênese, durante o reparo do tendão. No entanto, a resposta da irradiação em células parece ser dependente dos parâmetros utilizados. O tratamento com 40 mW durante 10 segundos promoveu aumento da neovascularização de partida depois de três dias de aplicação. Já o tratamento com potência de 10 mW mostrou mais vasos cinco dias após a irradiação. No sétimo dia, o grupo irradiado com 40 mW teve menor número de vasos do que o observado no quinto dia.

Diversos pesquisadores têm estudado várias modalidades terapêuticas com o objetivo de acelerar o processo regenerativo, e assim demonstraram que a fotobiomodulação, através da radiação *laser* de baixa intensidade com os diferentes comprimentos de onda, interação de diferentes formas no reparo tendíneo, com efeitos positivos⁶. A utilização de diferentes metodologias e parâmetros durante os experimentos dificultam uma comparação mais acurada entre os trabalhos, o que repercute numa dificuldade de padronização na prática clínica.

23.5.2 Reparação tecidual cutânea

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, correspondendo a 16% do peso corporal, e representa a interface do organismo com o ambiente externo. Esse órgão cutâneo recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituído de duas camadas originadas de dois folhetos germinativos distintos. A epiderme é o tecido epitelial de superfície, derivado do ectoderma cutâneo. A derme é a camada mais profunda, constituída de tecido conjuntivo denso, não modelado, derivado do mesoderma. A rede de tecido conjuntivo embrionário, ou mesênquima, derivado do mesoderma, forma o tecido conjuntivo da derme. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme, que não faz parte da pele, mas a mantém unida aos órgãos.

Com múltiplas funções, este grande órgão atua na função de proteção do organismo contra agentes físicos, químicos e infecciosos, além de prevenir a eliminação excessiva de água por evaporação, ou o seu ganho. Funciona como sistema refrigerador, uma vez que as glândulas sudoríparas secretam

um fluido para resfriar o corpo, enquanto os pelos e uma camada subjacente de gordura isolam contra o frio.

Diante de um trauma tecidual ocorre uma série de eventos vasculares, celulares e bioquímicos que serão responsáveis pela substituição das células mortas ou danificadas por células saudáveis, ocorrendo, assim, o processo de reparação tecidual. Esse processo de reparação não é completamente regenerativo, pois o fechamento da ferida pelo tecido cicatricial restabelece a integridade dérmica, mas faltam folículos pilosos e outros apêndices dérmicos, o que leva a um padrão desorganizado de deposição de colágeno e menor resistência do tecido em relação à pele íntegra¹⁷⁵.

Tazima et al.¹⁷⁴ reúnem os principais eventos envolvidos no reparo de feridas, sendo estes divididos em três fases principais: fase inflamatória, fase proliferativa (que incluem re-epitelização, síntese da matriz e neovascularização) e fase de maturação. Segundo os autores, o primeiro processo no reparo tecidual inicia com a fase inflamatória, que, de início, envolve a formação do coágulo através das plaquetas, hemácias e fibrina trazidas com o sangramento. O coágulo tem como finalidade criar uma barreira contra a contaminação. Com a lesão tecidual há a liberação de vários mediadores, tais como fator de ativação de plaquetas, fator de crescimento, serotonina, adrenalina e fatores do complemento, entre outros. Essa fase dura cerca de três dias e é de vital importância para o processo de cicatrização.

A fase proliferativa é caracterizada pela formação de tecido de granulação, constituído por um leito capilar fibroblasto, macrófagos, um fraco arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Essa fase é composta de três eventos importantes: neoangiogênese, que é processo de formação de novos vasos sanguíneos, necessários para manter o ambiente de cicatrização da ferida; fibroplasia, que consiste no surgimento dos fibroblastos no local da inflamação, que irão sintetizar o colágeno responsável pela sustentação e força tênsil da cicatriz; epitelização, que acontece entre as primeiras 24 a 36 horas, na qual ocorre a proliferação celular do epitélio. A epitelização envolve uma sequência de alterações nos ceratinócitos da ferida: separação, migração, proliferação, diferenciação e estratificação. Assim, a matriz extracelular substitui rapidamente o coágulo depositado no leito da ferida logo após o trauma, tendo como principal função a restauração da continuidade do tecido lesado, funcionando como um arcabouço para a migração celular.

Segundo os mesmos autores, a fase de maturação está relacionada com o processo de contração da ferida, reduzindo a quantidade e o tamanho da cicatriz desordenada. Nessa fase ocorre uma remodelação do tecido cicatricial formado na fase anterior. O alinhamento das fibras é reorganizado a fim

de aumentar a resistência do tecido e diminuir a espessura da cicatriz, reduzindo a deformidade. A maturação da ferida tem início durante a terceira semana e dura toda a vida da ferida.

A cicatrização é um processo que tem sido muito estudado atualmente. Diversas pesquisas têm demonstrado a eficácia da estimulação através de luz na reabilitação funcional e estética da pele.

Entre os recursos mais utilizados nas últimas décadas, a fotobiomodulação pela luz vermelha ao infravermelho usando *laser* de baixa potência (LBT), ou *low level laser therapy* (LLLT), tem se mostrado como acelerador no processo de cicatrização de ferida. A fotobioestimulação promovida pelo *laser* de baixa potência tem sido empregada de maneira bastante eficaz, no pós-operatório de feridas cirúrgicas e no tratamento de lesões ulceradas, resultando em uma reparação tecidual mais rápida e com padrão de qualidade histológica superior.

Baldan e colegas¹² investigaram os efeitos de diferentes doses de *laser* de diodo (λ 670 nm) de baixa potência na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Os ratos foram divididos em quatro grupos: CG, grupo controle; G2, grupo 2, 0,06 J; G3, grupo 3, 0,15 J; G4, grupo 4, 0,057 J. A aplicação da radiação iniciava-se imediatamente após a cirurgia durante três dias consecutivos, sendo a área irradiada em 12 pontos do retalho cutâneo e avaliada após sete dias do pós-operatório. Os resultados mostraram que a irradiação com *laser* de diodo (λ 670 nm) de baixa intensidade, com oferta de 0,57 J de energia por ponto (densidade de energia de 20,36 J/cm²), influenciou positivamente a viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos.

Silva et al.¹⁶⁰ avaliaram a eficácia da laserterapia de baixa intensidade no processo inflamatório, a cicatrização e epitelização de enxertos cutâneos por semente em ratos. Vinte ratos foram submetidos a essa técnica de enxertia e divididos em dois grupos iguais, um tratado com *laser* (GL) e um controle (GC). O GL (n=10) recebeu no pós-operatório imediato, 72 horas depois e no sétimo dia, irradiação com *laser* de baixa intensidade 6 J/cm² /18 s em cada ponto enxertado. Os resultados demonstraram um menor tempo de reação inflamatória, maior velocidade de cicatrização, epitelização e queratinização nos animais tratados com *laser* em relação aos não tratados. Resultados positivos também foram encontrados por Neves e colegas¹¹¹ ao tratar com *laser* λ 830 nm (30 mW, 2,52 J, 36 J/cm², 84 segundos), retalhos cutâneos de ratos Wistar submetidos à nicotina.

Cury e colegas³³ avaliaram os efeitos da laserterapia de baixa potência na angiogênese por meio de três mediadores importantes (VEGF, HIF-1 α e MMP-2) em um modelo de retalhos isquêmicos de ratos, utilizando *laser* de

λ 660 nm e λ 780 nm em densidade de energia de 30 J/cm² e 40 J/cm². Sesenta ratos foram divididos em cinco grupos (SF-NI, grupo controle; SF-R30, λ 660 nm, 30 J/cm²; SF-R40, λ 660 nm, 40 J/cm²; SF-IV30, λ 780 nm, 30 J/cm² e SF-IV40, λ 780 nm, 40 J/cm²). A irradiação com *laser* foi realizada em 24 pontos, abrangendo os retalhos e a pele circundante, imediatamente após a cirurgia e durante sete dias consecutivos. Os resultados demonstraram que ambos os *lasers* λ 660 e λ 780 nm foram capazes de modular a secreção de VEGF, a atividade de MMP-2 e de expressão de HIF-1 α de um modo dependente da dose. Assim, a LBP pode melhorar a cicatrização de enxertos de pele, aumentando a quantidade de novos vasos formados no tecido.

Além desses citados acima, vários estudos experimentais, de diversos autores, avaliam a eficácia da aplicação de luz *laser* no estudo de cicatrização envolvendo a epiderme e derme.

Nos últimos anos, a fototerapia por luzes coerentes (*lasers*) destaca-se como método bioestimulador para o reparo tecidual, que aumenta a circulação local, proliferação celular e síntese de colágeno. Vários estudos clínicos avaliaram a fototerapia no tratamento de cicatrizes e reparo tecidual, mas diferem quanto aos tipos e dosimetrias utilizados (comprimento de onda, potência, intensidade). Apesar da atual discussão da luz, a dose de energia é uma interrogação para vários pesquisadores e clínicos. No que tange ao limiar energético de biomodulação, há várias controvérsias. Os *lasers* com diferentes doses de energia produzem determinados efeitos sobre os vasos sanguíneos da pele, que geram ceticismo a respeito da real eficácia na cicatrização tecidual.

Segundo Lins e colaboradores⁹², alguns estudos não especificam a dosimetria utilizada para promover os efeitos bioestimulantes, gerando, assim, resultados conflitantes. Portanto, as diferentes dosimetrias utilizadas pelos trabalhos de pesquisa devem ser comparadas a fim de formar protocolos de aplicação clínica, possibilitando a utilização desse agente terapêutico com maior conhecimento e adequadas indicações. Dessa forma, um número ainda maior de estudos é necessário para que seus resultados e as indicações de diferentes parâmetros do *laser* sejam comparados e possam ser bem empregados na clínica.

23.5.3 Reparo ósseo

Atualmente, o *laser* tem sido empregado nos mais diversos campos, principalmente na área médica, em cirurgias e na laserterapia para reparo ósseo e tecidual.

O osso é um tecido conjuntivo composto por 75% de fração inorgânica, que corresponde aos minerais, principalmente cristais de hidroxiapatita, e 25% de matéria orgânica, incluindo o colágeno e proteínas que são responsáveis pela elasticidade óssea. O tecido ósseo é formado por uma matriz intercelular calcificada na qual estão mergulhadas suas principais células: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Sua função é de grande importância para o ser vivo, pois sustenta e protege os órgãos do corpo, além de servir como alavanca para os músculos, impulsionando a movimentação, e como reservatório de íons cálcio.

Apesar da aparência rígida e resistente do osso, este está crescendo e remodelando-se constantemente, mantendo-se ativo. O osso possui um elevado potencial de regeneração. Ao ser lesionado por uma fratura, sua resposta resulta na cicatrização do tecido de maneira similar à que ocorre com sua estrutura inicial, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade. Dessa forma, em condições normais, a maioria das fraturas não apresenta problemas de consolidação. No entanto, essa capacidade de reparo apresenta limitações na ausência de suprimento sanguíneo, na instabilidade mecânica e na presença de grandes defeitos.

Com o intuito de otimizar a regeneração natural do tecido ósseo ou em outras situações que acarretam um aumento da fragilidade óssea, intervenções físicas, como o *laser* terapêutico de baixa potência (LLLT), têm sido estudadas com a finalidade de estimular a consolidação de fraturas através da aceleração da osteointegração ou osteogênese.

A absorção da radiação proveniente do *laser* de baixa potência pelo tecido ósseo provoca efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. Em seguida, efeitos indiretos são desencadeados, como o estímulo à microcirculação e ao trofismo celular, além de efeitos terapêuticos, os quais incluem efeito analgésico, anti-inflamatório, antiedematoso e estimulante do trofismo dos tecidos.

As pesquisas existentes na literatura científica demonstram que a irradiação do *laser* de baixa potência em tecidos lesionados, como é o caso do tecido ósseo, desencadeia efeito positivo no processo de regeneração, além de relatar também maior número de vasos sanguíneos e proliferação de células como fibroblastos. Entretanto, também existem estudos nos quais tecidos

irradiados com o *laser* de baixa potência não sofreram alterações ou ainda sofreram efeitos negativos à sua regeneração. Isso ocorre porque a composição e estrutura dos tecidos são diferentes, necessitando de doses e períodos de irradiação específicos. Resultados positivos somente serão obtidos a partir de técnicas corretamente aplicadas e doses selecionadas individualmente, visto que doses muito baixas não provocam efeitos e, em contrapartida, doses elevadas podem provocar danos ao tecido irradiado.

Pinheiro e colegas¹³⁴ buscaram avaliar histologicamente o efeito do *laser* de baixa potência sobre o reparo ósseo de defeitos padronizados em fêmures de ratos Wistar albinos submetidos a implante de osso bovino inorgânico Gen-ox®. Nesse estudo os ratos foram divididos em três grupos: o grupo I (controle, n = 6), grupo II (Gen-ox®, n = 09) e grupo III (Gen-ox® + LLLT, n = 09). A primeira irradiação ocorreu logo após a cirurgia, e então a cada 48 horas, transcutaneamente. Quatro pontos em torno da ferida eram irradiados com 4 J, ao todo 16 J por sessão. Os sacrifícios foram realizados 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. Os resultados mostraram que irradiação com *laser* de baixa intensidade (λ 830 nm) promoveu reparo ósseo mais avançado nos espécimes irradiados em relação aos não irradiados.

Como citado anteriormente, algumas pesquisas também demonstram que a radiação com *laser* de baixa potência pode atuar de maneira ineficaz, como é o caso do estudo feito por Riso e colegas (2010)¹⁴⁷. A intenção desse trabalho foi avaliar a densidade mineral óssea (DMO) em osteotomias transversais incompletas em tíbias de ratos Wistar. Estes foram divididos em três grupos: g I (n = 10), referência 15 dias; g II (n = 10), suspenso pela cauda e tratado com *laser* por 12 dias; e g III (n = 10), suspenso pela cauda por 36 dias, sendo que após o 21º dia iniciou-se tratamento com *laser* por 12 dias. O *laser* utilizado foi de Ga-Al-As, DMC – Flash Lase III®, com comprimento de onda λ 830 nm, 100 mW, 4J, 140 J/cm², 40 segundos de aplicação em 12 sessões. Os resultados não foram satisfatórios em nenhum dos grupos, demonstrando a ineficácia da terapia *laser* no processo de reparação óssea.

Weber e colegas¹⁸⁸ estudaram os efeitos histológicos da laserterapia de baixa intensidade associada a enxertos autógenos de osso sobre a regeneração de defeitos ósseos. Sessenta ratos Wistar foram utilizados em quatro grupos: G1, como grupo controle; G2, com aplicação de *laser* diretamente sobre a loja cirúrgica; G3, fototerapia *laser* sobre o enxerto; G4, com fototerapia *laser* sobre o enxerto e a loja cirúrgica. O protocolo utilizado para fototerapia *laser* (λ 830 nm, Φ = 0,5 cm², 50 mW, 10 J/cm²) foi de 10 J/cm² divididos em quatro pontos, aplicados em dias alternados por 15 dias. Os animais foram mortos 15, 21, e 30 dias após as cirurgias. Nos grupos em

que a fototerapia foi utilizada nos leitos cirúrgicos (G2 e G4) durante o transoperatório, a remodelação óssea foi quantitativa e qualitativamente mais evidente quando comparados com os grupos G1 e G3.

Pinheiro e colegas¹²⁷ realizaram um estudo para avaliar o efeito de fotobiomodulação do *laser* infravermelho sobre a incorporação de hidroxiapatita (HA; $\sim 960\text{ cm}^{-1}$) e a qualidade do tecido ósseo neoformado ao redor de implantes dentários, através de espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Foram utilizados 14 coelhos que receberam implantes de titânio na tíbia; oito deles foram irradiados com *laser* de $\lambda 830\text{ nm}$ (sete sessões a cada 48 horas de intervalo, $21,5\text{ J/cm}^2$ por ponto, 10 mW , $\Phi = 0,0028\text{ cm}^2$, 86 J por sessão) e seis serviram como grupo controle. Os animais foram sacrificados 15, 30 e 45 dias após as cirurgias. Os espécimes foram preparados adequadamente para a espectroscopia Raman e a microscopia eletrônica de varredura, e as devidas leituras do osso ao redor dos implantes foram realizadas. Os resultados mostraram resultados significativos na concentração de hidroxiapatita entre os espécimes do grupo irradiado e do grupo controle 30 e 45 dias após as cirurgias.

Gerbi e colegas⁵⁵ realizaram um estudo para avaliar histologicamente o efeito da fotobiomodulação *laser* no reparo ósseo de defeitos criados em fêmur de ratos *Wistar albinus* tratados ou não com proteínas ósseas morfogenéticas (em inglês, *bone morphogenetic proteins* – BMPs) e membranas bovinas orgânicas. A fototerapia *laser* ($\lambda 830\text{ nm}$, 40 mW , $\Phi = 0,6\text{ mm}$) totalizou 16 J/cm^2 por sessão. Os animais foram mortos nos períodos de 15, 21 e 30 dias. Os pesquisadores obtiveram resultados, referentes aos grupos irradiados em relação aos não irradiados, que evidenciaram, histologicamente, um incremento na deposição de fibras colágenas (15 e 21 dias), bem como uma quantidade aumentada de osso trabeculado bem organizado no final do período experimental de 30 dias. Concluiu-se que o uso de BMPs e membranas bovinas possui um efeito sinérgico aos efeitos fotobiomoduladores do *laser* no processo de reparo ósseo.

Em um estudo anterior utilizando um biomaterial diferente, Lopes e colaboradores⁹⁴ avaliaram a intensidade da HA fosfatada ($\sim 958\text{ cm}^{-1}$) em animais com fraturas completas tratados com fixação interna rígida (FIR) associada ou não a fototerapia *laser* e associada ou não a BMPs e regeneração óssea guiada (ROG). Para avaliação dos dados, foi utilizada análise por espectroscopia Raman, e os autores concluíram que a utilização de fototerapia *laser* associada a BMPs e ROG foi eficaz na melhora da reparação óssea em ossos fraturados devido ao aumento dos níveis de HA observado⁷⁴.

Pinheiro et al.¹³⁴ afirmaram que o uso da fototerapia LED associada ao MTA, BMPs e regeneração óssea guiada foi eficaz na melhora do reparo ósseo, quando utilizados os parâmetros LED (λ 850 \pm 10 nm, 150 mW, Φ = 0,5 cm², densidade de energia de 16 J/cm², dose total do tratamento de 112 J/cm²), com aplicações repetidas a cada 48 horas. Os resultados foram obtidos através de espectroscopia Raman, que avaliou os picos referentes ao conteúdo inorgânico (\sim 958 cm⁻¹) e ao conteúdo orgânico (\sim 1447 cm⁻¹). Os autores afirmaram, ainda, que o avanço na maturação óssea visto nos grupos irradiados está ligado ao aumento na deposição de colágeno. Esse fato está associado a habilidade dos osteoblastos irradiados em secretarem mais HAC.

Recentemente, Pinheiro e colegas (2013)¹⁰⁹ avaliaram, através de espectroscopia Raman, o reparo de fraturas cirurgicamente confeccionadas, tratadas com FIR, associada ou não com fototerapia *laser* (λ 780 nm, 50 mW, 16 J/cm², Φ = 0,05 cm², emissão contínua); associado ou não a enxerto de fosfo-cerâmica bifásica e β -trifosfato de cálcio e ROG. A espectroscopia Raman mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Grupo FIR + enxerto + fototerapia *laser* mostrou valores mais elevados, e grupo FIR + biomaterial, mais baixos. Em conclusão, os resultados da investigação foram clinicamente importantes, pois a análise espectral do componente ósseo (\sim 958 cm⁻¹) evidenciou aumento dos níveis de HA em locais fraturados usando a associação da luz de *laser* a um enxerto de cerâmica.

23.5.4 Reparo do tecido nervoso

Dentre as diversas patologias em que a laserterapia tem sido inserida, como traumatismos musculares, articulares, ósseos e cutâneos, existe também o tratamento com *laser* de baixa potência em nervos.

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central e periférico. Inseridos no sistema periférico encontram-se os nervos, cuja principal função é fazer o transporte de impulsos nervosos entre os órgãos e o sistema nervoso central. Dentre os nervos destaca-se o nervo ciático, que é o maior e mais longo do corpo humano, originando-se na coluna lombar, atravessando a região pélvica através da musculatura, descendo através da nádega, quadril, parte posterior da coxa, atrás do joelho e, depois disso, seguindo em pequenos ramos pela parte posterolateral da panturrilha seguindo até o pé. O nervo ciático é parte do sistema nervoso, e é responsável por transmitir dor e sensibilidade (núcleo especializado em coluna).

Assim como ocorre em outros tecidos, os nervos periféricos são estruturas que também estão suscetíveis a algum tipo de dano ou lesão, podendo sofrer incapacidade motora e sensorial importante. Tais lesões podem ser: ferimentos cortantes, por arma de fogo, traumas por alterações de temperatura, compressões, mecanismos de tração e ainda devido a causas infecciosas e tóxicas, sendo que pode haver diferentes mecanismos como laceração, avulsão, secção, estiramento, compressão e esmagamento. Essas lesões acabam comprometendo a integridade do tecido, produzindo disfunções importantes nas estruturas inervadas pelo nervo lesado, pois implicam alterações da condução nervosa e no transporte axonal. Em alguns casos, o elevado tempo de duração da regeneração nervosa pode acarretar incapacidades vitalícias. Buscando o retorno precoce da funcionalidade, o *laser* de baixa intensidade vem sendo utilizado com o intuito de acelerar o processo de regeneração do nervo afetado¹³.

A laserterapia de baixa intensidade é utilizada em várias pesquisas clínicas e experimentais nas lesões do SNP por ocasionar um estímulo na microcirculação, por meio da paralisação dos esfíncteres pré-capilares, provocando a vasodilatação de arteríolas e capilares, e por meio da neoformação vascular, levando, assim, a um aumento do fluxo sanguíneo na área irradiada. Também é empregada na cicatrização de vários tecidos, por estimular um aumento na produção de ATP celular, provocando aceleração na atividade mitótica celular. Nos estudos recentes sobre a influência do *laser* de baixa intensidade nas lesões do SNP, utilizam-se diferentes modelos, variando quanto aos comprimentos de onda (λ 632 nm a 904 nm), energia, densidade, tempo de intervenção, mecanismo e tipo de lesão, além de tratamento e forma de avaliação, funcional e morfométrica.

Diversas pesquisas vêm sendo conduzidas com o objetivo de determinar os parâmetros e tipos de estimulação que possam acelerar a regeneração e a recuperação funcional do nervo periférico, visando minimizar futuras disfunções.

O estudo realizado por Oliveira e colegas¹¹⁸ avaliou a ação precoce do *laser* de baixa potência juntamente com a ação do ultrassom no processo de regeneração de uma lesão em ratos. Um número de 24 ratos foi utilizado, sendo que 18 foram submetidos à cirurgia de lesão do nervo e três grupos de seis foram divididos da seguinte forma: o grupo I, controle, lesado, sem intervenção terapêutica; grupo II, intervenção terapêutica do *laser* ArGaAl (40 mW, 4 J/cm²); e grupo III, intervenção terapêutica do ultrassom pulsado. As intervenções terapêuticas foram iniciadas após 24 horas da lesão com

aplicações diárias durante 14 dias. Os resultados evidenciaram que a recuperação nervosa foi maior com a aplicação do *laser*.

De acordo com a literatura científica, a laserterapia também pode ocorrer de maneira ineficaz no tratamento de nervos ciáticos danificados, como no estudo realizado por Reis¹⁴⁶. Nesse trabalho, objetivou-se acelerar os processos regenerativos para poder analisar a influência da aplicação do *laser* de arsenieto de gálio e alumínio (λ 660 nm) sobre a recuperação funcional do nervo ciático de ratos. Um número de 12 ratos Wistar foi submetido a lesão e, em seguida, dividido em dois grupos de seis, um sendo o controle e o outro referente ao uso da terapia. Após a lesão, utilizou-se o *laser* de GaAlAs (λ 660 nm, 4 J/cm², 26,3 mW, feixe de 0,63 cm²), em três pontos equidistantes sobre a lesão, por 20 dias. Através desse estudo, pode-se concluir que os parâmetros e métodos empregados na laserterapia demonstram resultados nulos sobre o cálculo do índice funcional do ciático (IFC) no período avaliado.

Podemos, então, destacar os seguintes efeitos do *laser* no reparo tecidual: a indução da atividade mitótica das células epiteliais e dos fibroblastos; o incentivo à produção de colágeno; a inibição secretória de alguns mediadores químicos; a modificação da densidade capilar e o estímulo à microcirculação local. A laserterapia tem se mostrado uma alternativa anti-inflamatória com efeitos semelhantes aos observados na terapia farmacológica, inibindo e/ou diminuindo a concentração de prostaglandina ES2 (PGE2), ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e histamina. Além disso, o aumento do fluxo sanguíneo local melhora a acidose e, simultaneamente, promove a liberação e remoção de substâncias algicas.

A ação angiogênica associada ao incremento da atividade fibroblástica e de macrófagos parece ser o efeito mais animador dos *lasers* de baixa intensidade para o processo de cicatrização. A laserterapia tem sido usada há mais de 30 anos, e mais de 90% da literatura disponível relata efeitos positivos. Na presente revisão, evidenciou-se o efeito benéfico do *laser* na cicatrização e reparo tecidual, o que permite a aplicação da laserterapia como mecanismo coadjuvante ou alternativo de tratamento de diferentes tipos de lesão nos tecidos biológicos. Contudo, a consagração do *laser* como terapia exige um conhecimento da energia aplicada, uma investigação dos efeitos que produz no organismo e a aplicação de uma correta metodologia, além do estabelecimento de padrões de dosimetria de referência para cada tecido.

23.6 LASERS E SEU EFEITO ANTIMICROBIANO

Desde o surgimento das luzes do tipo *laser*, no século XX, as possibilidades do uso terapêutico da luz têm se ampliado a cada dia em todas as áreas do conhecimento humano. De acordo com sua interação com os tecidos irradiados, os *lasers* podem ser classificados em dois grandes grupos: os *lasers* cirúrgicos, ou que operam em alta potência, e os *lasers* não cirúrgicos, também conhecidos como *lasers* terapêuticos ou que operam em baixa potência. Recentemente, os diodos emissores de luz (LED) passaram a ser utilizados na área médica alternativamente ao uso de *lasers* convencionais. Os LEDs são dispositivos semicondutores que, quando polarizados adequadamente, emitem luz na faixa visível ou invisível. Embora tanto os *lasers* quanto os LEDs produzam luzes monocromáticas, os LEDs apresentam menor colimação e coerência, resultando geralmente em bandas de emissão mais largas, o que pode ser uma vantagem quando a complementaridade por um fotossensibilizador é desejada.

Com relação ao efeito das luzes na redução da microbiota presente, sabemos que esse efeito é altamente influenciado pelo tipo de luz utilizada. Atualmente, a ação antimicrobiana dos *lasers* que operam em alta potência está bastante estabelecida quanto ao fato de que as luzes atingem a superfície irradiada com altas temperaturas promovendo a esterilização local por ação térmica. Os *lasers* de baixa potência, por sua vez, têm como finalidade restabelecer o equilíbrio biológico celular melhorando as condições de vitalidade tecidual, sendo reconhecidos por sua ação analgésica, biomoduladora e anti-inflamatória sobre tecidos duros e moles. Esses efeitos são gerados por efeitos fotoquímicos e fotoelétricos em vez de efeitos térmicos, não apresentando, dessa forma, efeito antimicrobiano quando utilizados isoladamente.

No caso específico da terapia fotodinâmica, o efeito antimicrobiano pode ser atingido quando uma droga fotossensibilizadora é ativada por uma luz de baixa intensidade (*laser* ou LED), gerando substâncias que podem danificar e, em último caso, matar a célula alvo. Essa terapia foi inicialmente idealizada para o tratamento do câncer, com base na observação de que algumas moléculas não tóxicas – chamadas de fotossensibilizadores, como os derivados das porfirinas –, se acumulam principalmente nas células malignas. Durante a terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador é inicialmente administrado ao paciente por via sistêmica, o que, por si só, não causa dano aos tecidos saudáveis ou doentes do hospedeiro. Entretanto, quando uma luz (usualmente um *laser*) é aplicada nos tecidos que contêm a droga, esta é ativada, e os tecidos irradiados são rapidamente destruídos.

De modo geral, os fotossensibilizadores são moléculas que possuem a propriedade especial de absorver energia luminosa e utilizar essa energia para promover reações químicas nas células e tecidos submetidos à terapia fotodinâmica. Para tanto, os fotossensibilizadores devem ser capazes de absorver luz no comprimento de onda da luz emitida pelo aparelho utilizado. Como a maioria das células não apresenta componentes fotossensíveis, a utilização de um fotossensibilizador que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante. Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com fotossensibilizadores ou agentes cromóforos exógenos, como o azul de metileno e o azul de toluidina. No entanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Para serem clinicamente efetivos, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem apresentar danos tóxicos ao hospedeiro.

Durante a terapia fotodinâmica, os fotossensibilizadores em contato com as células-alvo passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores (Figura 23.1). Nesse estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular, iniciando a formação de oxigênio singleto altamente reativo (fotoprocesso tipo II, Figura 23.2a), ou interagir com outras moléculas, como aceptores de elétrons, resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoprocesso do tipo I, Figura 23.2b). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem então danificar componentes essenciais das células ou alterar sua atividade metabólica de maneira irreversível, resultando na morte da célula-alvo. Assim, a efetividade da terapia fotodinâmica combina dois princípios: o acúmulo preferencial de fotossensibilizador nas células-alvo e a irradiação precisa da luz, o que possibilita a ação seletiva e localizada da terapia.

A rápida emergência de resistência entre bactérias patogênicas tem levado a um interesse cada vez maior da comunidade científica em encontrar terapias antimicrobianas alternativas que, hipoteticamente, tornem o surgimento de espécies resistentes improvável. Exemplos dessas terapias incluem o uso de bacteriófagos, de peptídeos antimicrobianos e da terapia fotodinâmica. Estudos avaliando a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica em micro-organismos resistentes a antibióticos e normais verificaram que ambas as

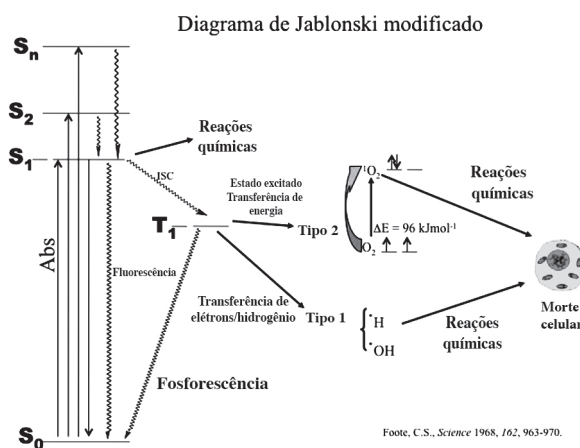


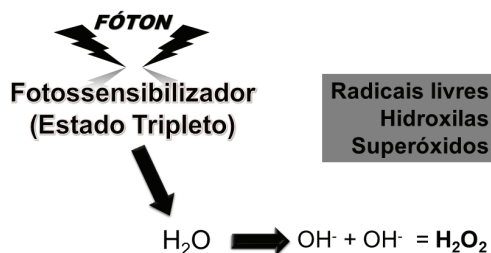
Figura 23.1 Diagrama de Jablonski modificado, demonstrando como um fotossensibilizador (FS), quando excitado por uma energia (E), sai do seu estado fundamental para um estado mais excitado, chamado singlete. Em seu estado singlete, a molécula poderá voltar ao seu estado fundamental (fluorescência) ou passar para um estágio intermediário denominado tripleto, e deste retornar ao seu estado fundamental (fosforescência). Em seu estado tripleto, o fotossensibilizador poderá reagir com as moléculas de O_2 presentes na vizinhança e desencadear as reações do tipo I e II, gerando produtos tóxicos e aumentando a citotoxicidade no interior das células tratadas.

cepas são suscetíveis a essa terapia quando a combinação apropriada de fotossensibilizador e luz é utilizada.

23.7 FOTOQUIMIOTERAPIA EM MICRO-ORGANISMOS

A fotoquimioterapia (*photochemotherapy*, em inglês) ou inativação fotodinâmica (*photodynamic inactivation* – PDI, em inglês), ou ainda quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (em inglês, *photodynamic antimicrobial chemotherapy* – PACT), são derivações da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana e utilizam desses químicos microbianos específicos (FS) que, quando iluminados, apresentam uma atividade muito intensa. A morte celular geralmente está relacionada com as espécies reativas de oxigênio, produzidas pelo fotossensibilizador e o oxigênio *in situ*. Como a oxidação resultante de moléculas biológicas não é específica, pode-se imaginar que poderão ter consequências na parede celular bacteriana, ribossomos, DNA e/ou enzimas^{54,150}.

REAÇÃO FOTODINÂMICA TIPO I



REAÇÃO FOTODINÂMICA TIPO II



Figura 23.2 Esquema descritivo do fotoprocesso tipos II (a) e I (b).

A fotoquimioterapia já era utilizada em 1500 a.C. na Índia e no Egito, onde era comum o uso de extratos de plantas e posterior exposição à luz solar como forma de tratamento de vitiligo. Porém, cientificamente, o seu uso foi constatado já no século XX, em 1948, quando Fahmy et al., na Universidade do Cairo, isolaram três compostos químicos a partir do fruto de uma planta *Ammi majus*. Eles chamaram esses três compostos de *ammoidin* (8-methoxypsoraleno), *ammidin* e *majudlin* (5-psoraleno)³⁰. Com o aparecimento de micro-organismos resistentes a antibióticos, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), outro termo para PDI, funcionou como um método alternativo e se mostrou eficaz em bactérias, fungos, vírus e protozoários^{150,39}.

A fotoquimioterapia de micro-organismos tem sido considerada uma terapia relativamente nova, uma vez que começou a ser empregada com sistemática científica recentemente¹³³. Baseia-se numa derivação da terapia

fotodinâmica antitumoral, que é uma forma de tratamento cuja eficácia depende da produção e liberação de altas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), após a administração tópica ou sistêmica de uma substância fotossensibilizadora, não tóxica e sensível à luz, seguida pela irradiação com uma luz visível em um comprimento de onda apropriado e na presença de oxigênio⁴³.

Porém, antes de 1400 a.C. os indianos deram início a essa terapia, visando ao tratamento do vitiligo, ao empregar um fotossensibilizador exógeno obtido de plantas (*Psoralenos*), usado na forma de uma loção aplicada sobre a pele e que era capaz de absorver a luz solar¹²⁸.

No início do século XX, Raab e Von Tappeiner, constataram acidentalmente que um meio de cultura contendo acridina diluída, quando exposto a uma luz intensa, apresentava, como consequência, a morte dos micro-organismos cultivados. Esses pesquisadores, em experimentos subsequentes, observaram que a associação do corante e da exposição à luz sobre os meios contendo os micro-organismos apresentava como resultado maior toxicidade, em relação àquela observada com o uso isolado de luz ou acridina. Postulou-se, portanto, que algum produto da fluorescência, e não a luz por si só, seria responsável pela elevada toxicidade observada¹²⁸.

Em 1913, Mayer-Betz fez uma autoinjeção de 200 mg do que ele pensava ser hematoporfirina pura e não sentiu nenhum efeito. Porém, ao se expor à luz, apresentou fotossensibilidade na pele por vários meses. Em 1924, ocorreu o primeiro relato de fluorescência espontânea de tumores induzidos experimentalmente com o auxílio de uma lâmpada de Wood. Nesse mesmo ano, Policard, postulou ser este fenômeno ocasionado pela porfirina¹²⁸.

Com o atual fenômeno da resistência aos antibióticos em diversas doenças infecciosas pelo mundo, o interesse por novas alternativas de tratamento vem se multiplicando. A fotoquimioterapia volta ao cenário de pesquisas como uma nova alternativa para o tratamento desses patógenos resistentes a fármacos, pois não existem relatos na literatura de micro-organismos resistentes à técnica, mesmo aqueles submetidos a vários ciclos de tratamento⁷⁷.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) também se baseia na junção de dois procedimentos: uma fonte de luz (meio físico) e um fotossensibilizador (meio químico). Com o objetivo de verificar o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) na desinfecção de águas contaminadas com *Escherichia coli*, utilizando diferentes fotossensibilizadores, foram realizados testes para determinar as melhores concentrações do fotossensibilizador para uso experimental. Os ensaios com micro-organismos mostraram efeitos inibitórios de crescimento e de mortandade (nas cepas de *E. coli*

estudadas) na presença de azul de metileno (AM) e verde malaquita (VM), com efeito altamente intensificado pela aplicação de luz, demonstrando que o sistema AM/LED e VM/LED podem ser uma alternativa para o controle de bactérias⁵⁶.

Na presença de oxigênio encontrado nas células, os fotossensibilizadores excitados podem reagir com moléculas de sua vizinhança através da transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação tipo I), ou pela transferência de energia para o oxigênio, levando à produção de oxigênio singleto (reação tipo II). Ambas as vias levam à morte das células ou tecido-alvo^{31,67}. As espécies reativas de oxigênio (EROs) atacam múltiplas moléculas responsáveis pelas mais variadas propriedades. A fotoquimioterapia não deve causar resistência às drogas utilizadas e merece atenção especial como uma nova estratégia para contornar esse problema tão comum encontrado no tratamento convencional de certas doenças³⁴.

A fotoquimioterapia é potencialmente segura, aplicável e oferece opções de tratamento para pacientes que sofrem de muitos problemas, se tornando uma outra opção de tratamento às quimioterapias tradicionais. Também não induz resistência aos micro-organismos e não necessita de inúmeras sessões de tratamento¹². Segundo a Sociedade Americana de Câncer, vários fatores são favoráveis ao tratamento com fotoquimioterapia: quando realizada corretamente, não apresenta efeitos colaterais em longo prazo; é menos invasiva que uma cirurgia; normalmente é um procedimento muito rápido e pode ser realizado em ambulatorios; seu alvo de atuação pode ser muito preciso; caso seja necessário, a técnica pode ser repetida várias vezes, ao contrário da radiação; além de apresentar pouca ou nenhuma cicatrização local. Sua desvantagem consiste basicamente no alcance da luz, ou seja, a técnica só funciona onde a luz possa chegar.

A utilização da fotoquimioterapia para o tratamento de algumas infecções ainda apresenta certas limitações que precisam ser superadas para aplicações terapêuticas futuras significantes para o tratamento de doenças infecciosas, e a questão-chave consiste na melhor forma de entrega da luz e do fotossensibilizador às células-alvo. Além disso, é preciso determinar dosimetrias precisas, usando dispositivos de iluminação adequada com parâmetros bem definidos⁷⁷.

Tem sido proposto na literatura o uso da terapia fotodinâmica (TFD) para matar células microbianas, e um grande número de fotossensibilizadores e fontes de irradiação são reportados, em diferentes parâmetros e em diversas concentrações do corante. De acordo com a pesquisa de Prates e colegas¹⁴⁴, a TFD foi efetiva e apresentou aproximadamente 6 logs de morte

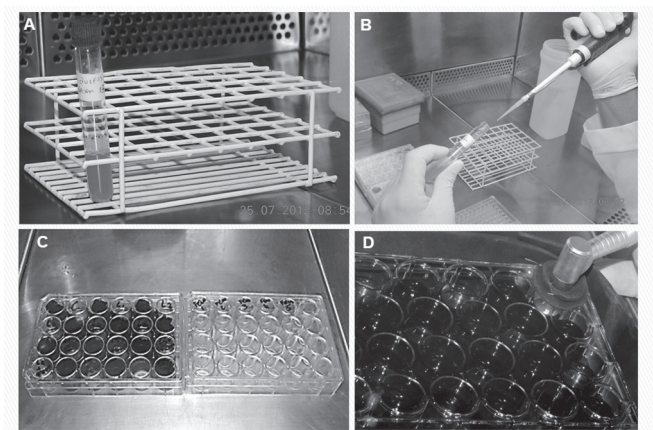


Figura 23.3 Metodologia da terapia fotodinâmica. (A) Cultivo celular. (B) Remoção da cultura celular para quantificação do inóculo inicial. (C) Organização e distribuição dos grupos em placas de 24 poços, alternados com poços pretos. (D) Irradiação dos grupos tratados.

celular em leveduras. Por outro lado, nem o fotossensibilizador ou a irradiação separadamente promoveram morte celular. Este resultado corrobora Queiroga¹⁴⁵, que utilizando a terapia fotodinâmica com azul de metileno e *laser* InGaAlP, promoveu a inativação significativa das espécies de *Candida* avaliadas (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilhermondii*, *C. krusei*),

Para que a TFD possa ser usada contra micro-organismos, para combater infecções localizadas difíceis de tratar, é necessário que o fotossensibilizador seja capaz de ser administrado de forma local, tópica ou intracavidade e, depois de um tempo adequado, proceder à irradiação da área infectada com luz em dose e comprimento de onda adequados, com fibra ótica, ponta difusora e outros, ou por iluminação direta da área exposta cirurgicamente⁹⁸.

Uma descrição da técnica geral pode ser vista na Figura 23.3.

23.7.1 Fotoquimioterapia em bactérias

A bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* é uma causa muito comum de infecções em humanos. Estudo com o *laser* pulsado matriz-assistido (MAPLE) pode ser utilizado para o crescimento de filmes finos compostos por poly (D,L-lactide) PDDLA-gentamicina que apresentam propriedades antimicrobianas. Esse filme inibe com eficácia o crescimento de *S. aureus*,

pois evita que a bactéria em associação com outros micro-organismos forme biofilmes que são mais resistentes aos antibióticos²⁶.

O laser de diodo λ 809 nm combinado com a indocianina verde eliminou todas as cepas de bactérias, tanto selvagens quanto resistentes, de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto o fotossensibilizador ou o laser sozinhos não tiveram efeito letal⁹.

Já o laser de Nd:YAG aplicado durante 15 minutos se mostrou eficiente para matar uma quantidade considerável de micro-organismos, como, por exemplo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra*. O laser de diodo AlGaInP e o corante azul de toluidina-O⁸⁵ (TBO) utilizados em culturas *in vitro* também reduziram a quantidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 61,53% em comparação ao grupo controle, enquanto em culturas de *Streptococcus sanguinis* essa redução foi ainda maior (84,32%)⁸⁴.

O LED azul, combinado com os fotossensibilizadores rosa de bengala ou

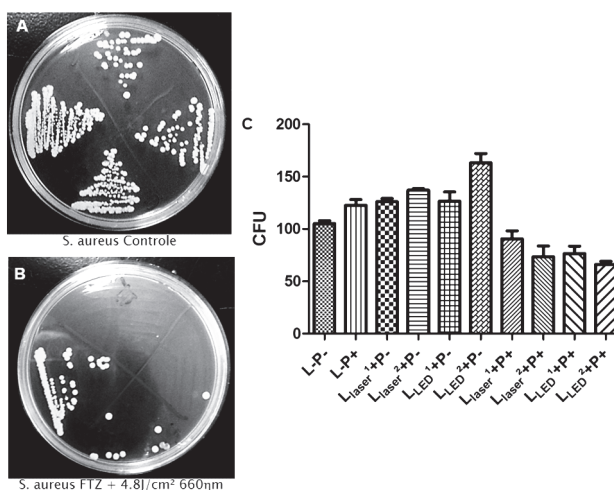


Figura 23.4 Resultados obtidos com a técnica em *S. aureus*. (A) Grupo controle demonstrando crescimento celular em todos os campos. (B) Grupo tratado com fenotiazina associada ao LED (4,8 J/cm²), demonstrando a eficácia do tratamento. (C) Gráfico de resultados.

eritrosina, reduziu a quantidade de biofilmes formados por *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus mutans*⁹⁶. O tratamento das *Streptococcus mutans* também pode ser realizado a partir do uso combinado de Radachlorin® com o laser de HeNe de comprimento de onda λ 633 nm³⁹. Esse mesmo LED,

quando irradiou o FS (curcumina), foi eficaz contra *Candida albicans*, tanto planctônicas quanto o biofilme³³.

Outro *laser* de baixa potência, InGaAlP – Indium Gallium Aluminum Phosphide, com comprimento de onda de λ 660 nm, utilizado em conjunto com o azul de metileno, reduziu a quantidade de colônias dos micro-organismos causadores de cáries⁵⁸.

Além dos fotossensibilizadores já citados, eosina Y, curcumina e rosa de bengala, quando ativados pela luz azul (λ 450 nm a 500 nm), conseguiram reduzir as colônias de *Enterococcus faecalis* em cultivo líquido. Essa combinação em biofilme tornou-as completamente inviáveis. Já a luz azul, quando utilizada de forma individual, não teve nenhum efeito na cultura bacteriana⁹⁹.

A irradiação com luz visível de λ 405 nm teve efeito letal nos endósporos das bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*⁷⁷. Os endósporos bacterianos são muito resistentes aos tratamentos normalmente utilizados, como, por exemplo, o aquecimento.

Nosso grupo tem obtido resultados extremamente positivos na aplicação da técnica em bactérias, como pode ser visto na Figura 23.4.

23.7.2 Fotoquimioterapia em fungos

A TFD também é apresentada como uma solução alternativa para o tratamento de doenças causadas por fungos, como a *Candida*. Muitas vezes inofensiva na cavidade humana normal, espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, podem levar a infecções da mucosa como a candidíase orofaríngea⁷⁸. Destacando-se estudos voltados para *Candida albicans*, as infecções causadas por esses fungos podem ser graves, especialmente em pacientes imunocomprometidos e debilitados (infectados pelo HIV; transplantados; portadores de linfomas; com deficiências nutricionais; com distúrbios metabólicos, como diabetes, neoplasias, xerostomia secundária à radioterapia, efeitos colaterais dos medicamentos, envelhecimento e síndrome Sjögren). Estudos têm relatado que infecções com diferentes tipos de *Candida*, em casos de pacientes com HIV, apresentam sintomas mais graves, isto é, são mais difíceis de tratar do que as infecções somente com um tipo de *C. albicans*^{78,115}.

Mang e colegas¹⁰⁰ demonstraram que o fotossensibilizador Photofrin® estimulado por TFD pode eliminar espécies de *Candida* com grande eficiência. Outras *Candida* isoladas de pacientes com AIDS que demonstraram

resistência ao fluconazol e anfotericina B foram igualmente suscetíveis à morte fotodinâmica. Desse modo, a utilização da TFD em pacientes já sensíveis por conta de outro quadro clínico pode ser uma forma de oferecer a essas pessoas uma melhor qualidade de vida, aliviando os sintomas da doença e diminuindo o efeito de doenças secundárias, causadas pelo tratamento convencional. Para Lyon e colaboradores⁹⁷, a fotoquimioterapia é um tratamento antifúngico alternativo que pode alcançar um desempenho mais eficaz com menos desconforto ao paciente.

Do mesmo modo que nos demais micro-organismos, a fotoquimioterapia se utiliza da luz em um comprimento de onda específico para ativar um fotossensibilizador não tóxico na presença de oxigênio, a fim de irradiar a célula-alvo⁵¹. A metodologia empregada varia, pois a fotoquimioterapia depende, dentre outros fatores, do tipo da célula, tipo de *laser*, da área irradiada e, principalmente, do fotossensibilizador. A classe frequentemente empregada de fotossensibilizadores é o azul, corantes conhecidos como sais fenotiazínicos, incluindo o azul de toluidina, azul de metileno e corantes azuis¹¹⁶. O tratamento tem como mecanismo de ação a inibição da 14 α -dimetilose, que está presente no citocromo P-450 da célula fúngica. Normalmente, estudos têm atribuído à utilização de uma fonte de *laser* em torno de λ 630 nm⁷⁸.

Diversos estudos estão sendo realizados com o intuito de verificar a eficiência desse tipo de tratamento em diferentes micro-organismos, uma vez que os micro-organismos continuam sendo a maior causa de infecções em feridas cirúrgicas, irritações de pele, dentre outros problemas, e os regimes profiláticos estão cada vez mais difíceis por causa do surgimento de espécies resistentes. De acordo com Prates e colegas¹⁴³, a incidência de micoses invasivas tem aumentado significativamente ao longo das últimas três décadas, e agora representa uma ameaça crescente para a saúde humana devido a uma combinação de difícil diagnóstico e uma escassez de drogas antifúngicas eficazes ao tratamento.

Lee e colegas⁸⁹ empregaram MAL-fotoquimioterapia (metílico 5-amino-levulinico ácido) para tratar pacientes com *Malassezia folliculitis*. Três de seis pacientes conseguiram uma forte melhora nas lesões após três sessões de TFD e um paciente apresentou uma melhora moderada.

A utilização da fotoquimioterapia em tratamentos odontológicos tem se destacado em doenças periodontais⁷⁸. Um dos grandes desafios encontrados nos tratamentos dessas doenças é que geralmente não se consegue a remoção completa dos antibióticos utilizados, por isso é possível que o micro-organismo crie resistência ao medicamento.

Esse desafio encontrado na terapia convencional pode ser solucionado com a fotoquimioterapia, uma vez que esta torna o tratamento mais eficaz, pois a radiação da luz consegue atingir locais de difícil acesso para o tratamento convencional. Desse modo, um dos benefícios dessa técnica é que ela não é prejudicada pela resistência dos micro-organismos; sendo assim, a utilização da fotoquimioterapia pode diminuir a necessidade de antibióticos. De acordo com Lyon e seus colaboradores⁹⁷, a fotoquimioterapia tem sido utilizada com sucesso no tratamento de doenças infecciosas, incluindo infecções fúngicas.

Ainda que os estudos apontem a eficiência da fotoquimioterapia no tratamento de diversas doenças, esta eficiência está sempre relacionada com as concentrações de fotossensibilizador e com a irradiação. Esse fato pode ser

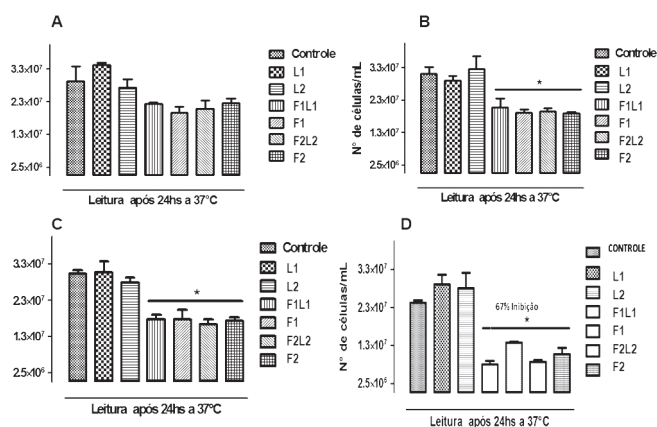


Figura 23.5 Resultados obtidos em experimentos utilizando *Cândida sp.* (A) Avaliação do crescimento celular utilizando fenotiazina (50 µg/mL) e luz laser L1 e L2 (4,8 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente), no tempo de pré-irradiação de 5 minutos. (B) Avaliação do crescimento celular utilizando fenotiazina (50 µg/mL) e luz laser L1 e L2 (4,8 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente), no tempo de pré-irradiação de 10 minutos. (C) Avaliação do crescimento celular utilizando fenotiazina (100 µg/mL) e luz laser L1 e L2 (4,8 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente), no tempo de pré-irradiação de 5 minutos. (D) Avaliação do crescimento celular utilizando fenotiazina (100 µg/mL) e luz laser L1 e L2 (4,8 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente), no tempo de pré-irradiação de 10 minutos.

observado no estudo de Mang e seus colaboradores¹⁰⁰, no qual a eficácia da fotoquimioterapia depende da proporção de concentração de corante utilizado para uma quantidade de células fúngicas. Os autores descrevem que para uma elevada densidade de *C. albicans*, uma alta concentração de

fotossensibilizador e, provavelmente, uma dose de luz elevada seriam necessários para obter uma fotoquimioterapia eficiente.

Sendo assim, é possível verificar que tanto a diversidade de micro-organismos como a diversidade de patologias e característica das áreas de atuação dificultam a definição de uma metodologia padrão que possa ser aplicada a cada tipo de infecção.

Outra grande área de utilização da fotoquimioterapia são as infecções fúngicas superficiais de pele. O estudo realizado por Dai e colegas³⁴ testou a eficácia da fotoquimioterapia usando uma combinação de corante azul (sal de fenotiazínico) e luz vermelha para a profilaxia e tratamento de *C. albicans* em infecção na pele de rato com feridas de abrasão. Esse estudo demonstrou que a TFD, com a combinação de corante azul e luz vermelha, pode reduzir significativamente a carga fúngica das feridas infectadas com *C. albicans*.

O tratamento de dermatose em pacientes utilizando aminolevulinato de metilo e irradiação de luz vermelha com comprimento de onda de λ 630 nm demonstrou que a fotoquimioterapia é eficiente para o tratamento de pacientes com pequenos números de lesões⁵⁰.

Alguns experimentos realizados por nossa equipe têm mostrado resultados significativos no tocante ao efeito da técnica em fungos (Figura 23.5).

23.7.3 Fotoquimioterapia em vírus

O aparecimento de verrugas intra-anais é comum em infecções causadas pelo papiloma vírus (HPV). A irradiação com um *laser* de comprimento de onda de λ 635 nm após o uso do *laser* de CO₂ diminuiu a quantidade de etapas e o tempo para o tratamento dessas verrugas em pacientes soropositivos¹⁵⁵. Já o azul de metileno e o *laser* vermelho foram eficientes para eliminar os vírus da herpes HSV-1 e HSV-2 sem atingir o núcleo das células dos pacientes. Além disso, esse uso combinado reduziu o retorno das lesões¹⁴⁰.

23.7.4 Fotoquimioterapia em protozoários

Peloi e colaboradores¹²² realizaram experimentos em ratos após indução da *Leishmania amazonenses*. O tratamento com azul de metileno e irradiação de diodo emissor de luz (LED) com comprimento de onda de λ 665 nm

e densidade de energia 5 mW/cm², durante um certo intervalo de tempo, se mostrou eficaz para a leishmaniose tegumentar americana.

Os fotossensibilizadores do grupo da benzofenoxazina hidrofílica catiônica, quando comparados com os similares hidrofóbicos aniônicos, têm um melhor resultado na terapia fotodinâmica devido ao fato de que a membrana do parasita tem carga negativa. A benzofenotiazina demonstrou ter uma melhor ação na leishmaniose cutânea, enquanto PpIX, uma molécula porfirinoide, teve uma ação menor³.

No caso da malária, experimentos *in vivo* demonstraram que o *laser* pulsado NIR com densidade de energia de 485 mW/cm² pode ser utilizado para matar *Plasmodium falciparum* em culturas de células de glóbulos vermelhos⁶⁹. Através desse artigo, pode-se concluir que a terapia fotodinâmica tem sido relatada com uma maior frequência em bactérias, principalmente em *S. aureus*, *S. mutans* e *S. sanguinis*, e os *lasers* utilizados são os mais diversos, como de diodo, Nd: YAG, HeNe, entre outros.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos com vírus, ainda existem poucas pesquisas nessa área. A aplicação do *laser* ou do LED é uma excelente alternativa para o tratamento de doenças virais, tendo em vista que o uso de medicamentos é dificultado pela constante taxa de mutações sofridas por eles.

Apesar dos estudos já descritos na literatura indicarem a eficiência da utilização da terapia fotodinâmica no tratamento de diversas patologias, o uso dessa fotoquimioterapia aplicada a micro-organismos requer mais estudos *in vitro* e *in vivo* para elucidação dos mecanismos de ação, dos efeitos, dos benefícios e das possíveis complicações, para que possa ser administrada a humanos com uma maior segurança e qualidade.

Um fotossensibilizador é uma molécula que age como um pró-fármaco, podendo ser natural ou sintética, inerte (não tóxica), e, na presença da luz, em um comprimento de onda específico, absorver essa energia luminosa e ser fotoativada. Esse precursor, chamado de fotossensibilizador, sofre excitação enquanto está sendo irradiado, passando a ser uma molécula farmacologicamente ativa. Após sua ativação pela luz, os fotossensibilizadores desencadeiam reações químicas que produzem diretamente ou indiretamente espécies citotóxicas, como radicais livres e oxigênio singlete⁸⁵.

Os fenotiazínicos são moléculas com potencial fotossensibilizante e grande propensão à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). São considerados hidrofílicos tricíclicos contendo nitrogênio e enxofre, e são conhecidos há mais de cem anos. Até agora mais de 5 mil derivados fenotiazínicos já foram obtidos, e essa classe vem se destacando por sua variedade

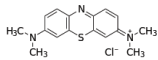
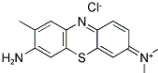
de propriedades químicas e biológicas. As fenotiazinas possuem um custo relativamente baixo, são facilmente encontradas e são bem toleradas. Estes compostos exibem atividade promissora contra bactérias, fungos, câncer, vírus, inflamações e protozoários, além de apresentarem propriedades anti-convulsivantes, analgésicas e imunossupressoras^{151,12}.

Durante o período inicial de pesquisa da terapia fotodinâmica moderna, os fenotiazínicos têm sido um padrão de fotossensibilizador bioativo, dando um rendimento razoável de oxigênio singleto (forma do oxigênio mais reativo e oxidante que o oxigênio molecular) e absorvendo luz na janela terapêutica (definida pela faixa de frequência na qual a laserterapia é mais efetiva) para terapia fotodinâmica (de λ 600 nm a λ 900 nm), sendo, assim, um ponto inicial de síntese de novas moléculas¹⁵².

O azul de metileno (MB) e o azul de toluidina (AT) (Tabela 23.1) são fotossensibilizantes fenotiazínicos aceitos na prática médica e de eficácia demonstrada em estudos na literatura. Possuem capacidade fotoantimicrobiana contra diferentes organismos, incluindo vírus, bactérias e fungos. Apresentam estrutura química e propriedades físico-químicas semelhantes. Embora suas propriedades sejam semelhantes, a eficiência fotodinâmica desses compostos varia segundo os diversos micro-organismos³¹.

O corante fenotiazínico AT é um corante aromático heterocíclico solúvel em água ou em álcool, que absorve intensamente na região espectroscópica do ultravioleta visível. É um agente fotossensibilizante muito eficaz na inativação de micro-organismos como bactérias e vírus¹⁵¹. O AT é uma fenotiazina análoga ao MB, com mínimas divergências estruturais, que seriam a presença de dois metilaminas no azul de metileno. Tem sido amplamente empregado na coloração biológica, especialmente na hematologia¹⁵².

Tabela 23.1 Derivados fenotiazínicos avaliados como potenciais fotossensibilizadores contra tripanossomatídeos

| SIGLA | NOME QUÍMICO | PM (G/MOL) | FÓRMULA MOLECULAR | ESTRUTURA QUÍMICA |
|-------|---|------------|----------------------|--|
| MB | 3,7-bis(Dimethylamino)-phenothiazin-5-ium chloride | 319,85 | $C_{16}H_{18}N_3Cl$ |  |
| TBO | (7-amino-8-methylphenothiazin-3-ylidene)-dimethylazanium chloride | 305,83 | $C_{15}H_{16}ClN_3S$ |  |

Ao mesmo tempo, a indústria farmacêutica tem empreendido esforços vigorosos no desenvolvimento de medicamentos para doenças causadas por tripanossomatídeos e, de fato, conseguiu surpreendentemente quando

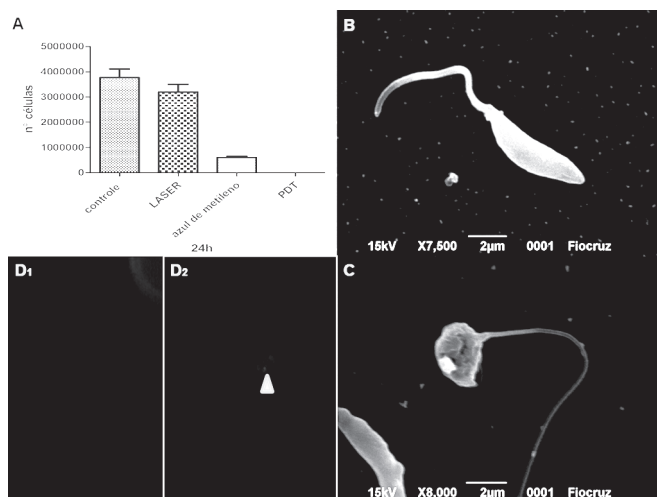


Figura 23.6 Resultados do protocolo utilizando leishmania: efeito da PACT sobre promastigotas. (A) Gráfico apresentando a inibição da proliferação celular. (B) Micrografia eletrônica de varredura de amostra controle, morfologia padrão de promastigota sem alterações morfológicas. (C) Micrografia eletrônica de varredura de promastigota tratada pela PACT, apresentando retração citoplasmáticas além de alterações microtubulares. (D1) Micrografia de fluorescência, utilizando MDC (sonda para detecção de autofagia), de promastigotas, controle apresentando ausência de autofagia. (D2) Micrografia de fluorescência, utilizando MDC (sonda para detecção de autofagia), de promastigotas tratadas pela PACT, apresentando marcação positiva para autofagia (seta azul).

considerou o seu conhecimento limitado às particularidades metabólicas dos parasitas. Pelos padrões terapêuticos modernos, no entanto, a maioria desses fármacos, se não todos, deve ser classificada como insatisfatória devido à sua grande toxicidade, eficácia limitada e desenvolvimento de resistência pronunciada^{27,154}. De fato, as várias formas de tripanossomíases e leishmanioses são comumente doenças negligenciadas, as quais matam cerca de 500 mil pessoas por ano. No fundo, esse cenário terapêutico frustrante tem cunho comercial, pois os altos custos atuais para o desenvolvimento desses novos fármacos não garantem um fácil retorno financeiro do investimento, visto que as doenças ocasionadas por tripanossomatídeos prevalecem em países com condições socioeconômicas desfavorecidas¹⁵⁴.

Nesse contexto, é considerando os impactos socioeconômicos mundiais, a importância para a saúde pública mundial e a necessidade de tratamentos mais eficazes e menos agressivos aos pacientes que este trabalho avaliará a opção de uso da fotoquimioterapia antiparasitária (QTFAp) como uma nova

forma de tratamento contra os tripanossomatídeos causadores da leishmaniose (Figura 23.6).

23.8 APLICABILIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ONCOLOGIA

O câncer é hoje um evidente problema de saúde pública mundial e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2030 espera-se uma incidência de 27 milhões de casos, com 17 milhões de mortes. No Brasil, as estimativas de 2012 e 2013 apontam para uma ocorrência de aproximadamente 518.510 de acometimentos, dentre os quais os tipos de câncer mais incidentes para o sexo masculino são os de pele (não melanoma), próstata, pulmão, cólon e reto e estômago. Para o sexo feminino, os mais comuns são os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide.

Nas últimas décadas, o progresso na pesquisa básica gerou uma melhor compreensão com relação à fisiopatologia dos tumores, levando inclusive ao desenvolvimento de novas drogas. Grandes ensaios clínicos foram realizados, e avanços, alcançados; porém, melhorias pouco significativas na terapia e muitas restrições a novos fármacos devido à toxicidade acarretam um baixo índice de novas drogas clinicamente aprovadas e liberadas pelos órgãos de fiscalização. A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido desenvolvida na esperança de atender a essa necessidade, apresentando-se como uma alternativa inovadora por ser minimamente invasiva, e, ao contrário do que acontece na quimio e na radioterapia, por ser menos demorada e causar menos efeitos adversos aos pacientes, o que torna possível sua aplicação ambulatorial^{2,128}.

A terapia fotodinâmica (TFD) utiliza um agente fotossensibilizante, luz e oxigênio molecular para matar seletivamente certos tipos de células. Na dermatologia e na odontologia, utiliza-se o TFD com sucesso no tratamento de câncer de pele não melanoma e lesões pré-malignas e câncer bucal, e uma das grandes vantagens é a possibilidade de administração tópica, permitindo a destruição do tecido canceroso e poupando o tecido periférico normal^{58,73,87,119,131,142}. Entretanto ainda não existe um protocolo definido quanto ao número de sessões e intervalo entre elas^{58,73}.

Um estudo para analisar as alterações morfológicas e ultraestruturais de células neoplásicas Hep-2 submetidas à TFD utilizou o zinco ftalocianina como corante. As células neoplásicas Hep-2 submetidas à TFD mostraram-se

fotodanificadas morfológica e ultraestruturalmente, sendo possível observar algumas alterações nas organelas celulares. Portanto, pode-se concluir que após TFD utilizando ZnPc essas células sofreram morte por apoptose⁷⁹.

Há muitos trabalhos mostrando a aplicabilidade dos *lasers* de baixa potência e dos diodos emissores de luz (LED) em diversas áreas, seja na biotecnologia, nos processos biológicos ou nas inúmeras áreas da saúde, sendo os dois (*laser* e LED) muito similares no que diz respeito à eficácia do tratamento por fototerapia. No entanto, percebe-se que ainda não existe um consenso geral quanto ao protocolo exato a ser utilizado, tais como a quantidade, potência e tempo de aplicação. Espera-se que em um futuro próximo esses problemas acabem pelo contínuo avanço nos estudos e pesquisas, utilizando as diversas formas de luz.

A TFD é definida como uma terapia por reação fotoquímica direcionada a um controle localizado de um tecido doente, com o objetivo de causar destruição seletiva dessa região. É uma técnica terapêutica composta de duas etapas, na qual inicialmente utiliza-se uma droga sensibilizante (fotossensibilizador), seguida pela etapa de irradiação de uma luz visível e ativação desses compostos. Os fotossensibilizadores quando ativados transferem então a energia fornecida ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) e induzindo a morte celular. A afinidade do fotossensibilizador pelas células tumorais permite um alto direcionamento ao local afetado, possibilitando um tratamento localizado, uma vez que o tempo de meia-vida das ROS é muito curto e não permite a difusão desses compostos a outras regiões do tecido^{2,128}.

Apesar da utilização da luz solar pelos povos antigos no tratamento de diversas condições, como vitiligo e psoríase, estudos da utilização da luz como modalidade terapêutica propriamente dita só começaram a se desenvolver no início do século XX. Os primeiros experimentos sobre o assunto foram descritos por Oscar Raab em 1900 e consistiam na descrição do efeito fotodinâmico da laranja de acridina em protozoários e paramécio, na presença de luz solar. Tal observação levou ao desenvolvimento de compostos derivados da hematoporfirina que posteriormente foram utilizados como marcador fluorescente para o diagnóstico do câncer¹²⁸.

Porém, só em 1972, a partir das pesquisas de Diamond et al., mostrou-se a possibilidade de os fotossensibilizadores serem utilizados em aplicações terapêuticas, após a verificação da eficácia da TFD no tratamento de gliomas de ratinhos¹²⁸. Atualmente, os estudos com essa modalidade intensificaram-se, mostrando as potencialidades terapêuticas da TFD no tratamento

de câncer de cabeça e pescoço, cérebro, pulmão, pâncreas, cavidade intraperitoneal, mama, próstata e pele².

Apesar dos resultados promissores, só em 1993 se deu a aprovação do primeiro fotossensibilizador, ocorrida no Canadá. Tratava-se do Photofrin® (um derivado da hematoporfirina), para o tratamento do câncer da bexiga. Mais tarde, este foi aprovado pela agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do câncer esofágico. Hoje, existem já alguns fotossensibilizadores aprovados em vários países para aplicações em TFD¹²⁸.

Evidencia-se, portanto, a necessidade de mais estudos para estabelecer o valor da TFD em comparação com os tratamentos convencionais em termos de eficácia, tempo de recuperação, complicações, aceitabilidade do paciente e custos². Ainda assim, nos últimos anos, a terapia tem ganhado espaço, tendo sido indicada e utilizada principalmente na dermatologia, para o tratamento de câncer de pele, progredindo de um recurso terapêutico experimental para a primeira opção no tratamento de lesões como queratoses actínicas e outras lesões superficiais como carcinoma basocelular superficial e doença de Bowen⁵⁸. Tendo em vista que a terapia fotodinâmica apresenta como características uma baixa toxicidade ao tecido normal, efeitos sistêmicos mínimos, morbidade em longo prazo bastante reduzida e falta de mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida, essa poderá se tornar uma opção terapêutica valiosa para o tratamento do câncer, ou ainda ser combinada a outros tratamentos contra o câncer².

23.8.1 Os efeitos biológicos da terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica está baseada no princípio de que a ativação de um fotossensibilizador pela luz visível cria espécies de oxigênio citotóxicos e radicais livres, que destroem seletivamente as células de proliferação rápida como o câncer²². Para realizar a TFD são necessários três elementos: agente fotossensibilizante, luz e oxigênio. Basicamente, essa técnica consiste em duas etapas: primeiro o agente fotossensibilizante acumula-se nas células tumorais após a administração tópica ou sistêmica. Em seguida, o tumor fotossensibilizado é exposto à luz de comprimento de onda específico para o espectro de absorção do agente fotossensibilizante (ativação do fotossensibilizador)¹⁴².

A TFD baseia-se em reações fotooxidativas, nas quais o fotossensibilizador, após ser excitado pela luz, passa do seu estado fundamental (S_0) para

seu primeiro estado excitado (S_1), de meia-vida curta. Nesse momento, as moléculas podem voltar ao estado de repouso, liberando energia em forma de fluorescência por meio da emissão de fótons ou prosseguir na cadeia de reações químicas, até alcançar o estado tripleto, de meia-vida mais longa. As moléculas no estado tripleto transferem sua energia diretamente ao oxigênio intracelular, formando o oxigênio singleto (1O_2), altamente reativo, de meia-vida curta e responsável pela morte celular. O fotossensibilizador excitado (tripleto) pode reagir com moléculas do substrato biológico, formando radicais que reagem com o oxigênio gerando oxidação (reação do tipo I), ou transferir a energia diretamente ao oxigênio, gerando o oxigênio singleto (reação do tipo II). O oxigênio singleto reage com moléculas no interior da célula e nas membranas, causando o dano celular. A oxidação dos constituintes celulares pelos oxigênios reativos danificam as membranas plasmáticas e as organelas celulares, com subsequente alteração de permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelular. Alterações nas membranas do núcleo, mitocôndria, lisossomos e retículo endoplasmático também ocorrem. Fotossensibilizadores que se localizam preferencialmente nas mitocôndrias levam a célula principalmente à apoptose, enquanto fotossensibilizadores que se localizam nos lisossomos ou nas membranas, em geral, promovem tanto a apoptose quanto a necrose^{14,58,142}.

A destruição direta das células tumorais deve-se aos danos fotodinâmicos de caráter irreversível provocados molecularmente em determinados alvos subcelulares. A natureza molecular dos alvos foto-oxidados influencia extensamente as vias de sinalização e os tipos de morte que são posteriormente desencadeados pela TFD¹²⁸. A TFD pode ativar três principais vias de morte celular: morte celular por apoptose, necrose e autofagia².

Acredita-se que as doses mais baixas de TFD levam a mais células apoptóticas, enquanto doses mais elevadas conduzem a proporcionalmente mais células necróticas. A meta mais importante da TFD em vias de sinalização celular é a ativação da via pró-apoptótica da família de proteínas Bcl. Os danos provocados pela luz em Bcl-2 induz a apoptose em células cancerosas. Outros estudos descobriram que proporções elevadas de morte celular após a TFD ocorrem quando há uma forte evidência de caspases 3 e 9 presentes no lisado celular, indicando que a TFD deve ativá-los dentro da via de morte celular. Tem sido sugerido que a apoptose e a necrose apresentam percursos de iniciação comum e que o resultado final é determinado pela presença de uma caspase ativa. Isto implica na inibição da apoptose e direciona as células a necrose, de modo que as células suficientemente danificadas pela TFD são destruídas, independentemente do mecanismo envolvido¹²⁰.

Estudos recentes mostraram que a TFD pode induzir autofagia, eventualmente, devido à alta reatividade das ROS produzidas. A autofagia é iniciada numa tentativa de remover as organelas lesadas ou para degradar agregados de proteínas, produzidas pelas reações fotodinâmicas, as quais não podem ser removidas pela ubiquitina. No entanto, como a autofagia é um processo autolimitado, é possível que a sua persistência induza um colapso metabólico e bioenergético suficiente para provocar a morte celular. A localização subcelular específica ou a organela celular onde ocorrem danos provocados pelas ROS são fatores que influenciam o resultado do processo autofágico¹²⁸.

A TFD mostrou causar dano oxidativo nas bases do DNA, rupturas dos filamentos e ligações cruzadas. O potencial mutagênico varia entre tipos de células, refletindo possivelmente diferenças nos mecanismos de vigilância, capacidade de reparação ou dano. Pode-se concluir que os efeitos prejudiciais para o DNA da TFD não são apenas dependentes das variáveis da TFD, mas dependem também dos mecanismos celulares de reparação¹²⁰.

Desde o início dos anos 1980 foi observado que um mecanismo adicional indireto coexiste com o efeito citotóxico da TFD: trata-se do efeito de obstrução vascular, o qual provoca morte por indução de isquemia. Posteriormente, vários estudos pré-clínicos demonstraram que os mecanismos relativos aos efeitos vasculares variam segundo os fotossensibilizadores e tecidos-alvo¹²⁸.

Estudos recentes demonstram que a TFD induz uma resposta imune no hospedeiro. Esta tanto pode ser imunoestimulatória quanto imunossupressiva. Uma resposta imunoestimulatória pode melhorar ainda mais os efeitos terapêuticos no tumor primário, assim como nas metástases. Apesar de a TFD ter a capacidade de estimular uma resposta imune antitumoral, esta nem sempre se verifica. A explicação para esse acontecimento pode ser a disfunção das células dendríticas causada pelo tumor, que leva a uma resposta imunossupressiva^{120,128}.

23.8.1.1 Fotossensibilizadores

Existem vários fotossensibilizadores que têm alcançado bons resultados no tratamento oncológico, porém apenas alguns estão disponíveis comercialmente, enquanto outros se encontram em nível de ensaios clínicos. Os fotossensibilizadores são fundamentais para a TFD, e, nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de um fotossensibilizador ideal.

As características ideais para um fotossensibilizador seriam ter alta seletividade e retenção para o tecido-alvo, capacidade para a formação de espécies citotóxicas, pureza e estabilidade química, absorver a luz em comprimentos mais longos (λ 600 nm a 850 nm) para maior penetração da luz nos tecidos, elevado rendimento quântico tripleto, de oxigênio singleto, devendo essas espécies reativas apresentarem um tempo de semivida relativamente elevado. Não deve apresentar toxicidade no escuro nem provocar efeitos mutagênicos e carcinogênicos, e deve possuir estrutura anfifílica para facilitar a biodistribuição nos tecidos, e ser facilmente eliminado pelo organismo¹²⁸.

A questão da seletividade dos fotossensibilizadores às células tumorais ainda não foi bem elucidada; porém, as hipóteses levantadas para explicar o acúmulo preferencial do fármaco nas células cancerosas são de que as características lipofílicas desses compostos apresentam alta afinidade aos receptores de LDL (*low density lipoprotein*), expressas em grande número nas células tumorais e essenciais ao seu rápido desenvolvimento. Porém, esse mecanismo ainda continua a ser debatido, pois existem fotossensibilizadores com alta afinidade para LDL, porém baixa seletividade tumoral, assim como há aqueles com baixa afinidade ao LDL, porém alta seletividade tumoral. Além disso, supõe-se que um grande espaço intersticial (maior quantidade de lipídeos, fibrina e colágeno) e especialmente uma grande vascularização tumoral associada a uma baixa drenagem linfática possam estar ligadas a esse acúmulo preferencial. Outro fator relevante seria o fato de que o aumento do processo glicolítico anaeróbico em tumores hipóxicos provoca acidose no fluido intersticial e aumento de cargas negativas na membrana dessas células, fomentando a retenção de compostos que se tornam mais protonados em condições ácidas¹⁰⁹.

Como dito anteriormente, o primeiro fotossensibilizador aprovado foi o Photofrin®, seguido do desenvolvimento de vários outros, que hoje são divididos em três gerações: os de primeira geração, ou de tipo porfirínico; os de segunda geração, que incluem vários derivados de porfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas e baterioclorinas; e os de terceira geração, que incluem fotossensibilizadores com maior solubilidade (menor lipofilicidade)¹²⁸.

Dentre os fotossensibilizadores mais utilizados na prática clínica, notadamente o Photofrin®, pode-se observar um baixo coeficiente de absortividade, o que implica na administração de grandes quantidades do composto para que seja obtida uma resposta fototerapêutica eficiente. Apresentam também baixa penetração dos tecidos pela luz, porque seu máximo de absorção não passa dos λ 630 nm, e baixa velocidade de eliminação, causando

fotossensibilidade prolongada da pele mesmo após a finalização do tratamento¹⁰⁹. Devido a esses efeitos, vários trabalhos recentes têm focado no desenvolvimento de veículos para melhorar a seletividade desses fotossensibilizadores, de modo a aumentar a captação tumoral. Dentre os melhores candidatos, encontram-se as emulsões de lipossomas e nanopartículas. Porém, tem sido observado que esses veículos podem diminuir o rendimento quântico de oxigênio singleto, uma vez que o oxigênio singleto formado tem que se difundir para fora do sistema e, como o seu raio de ação é muito curto devido ao seu pequeno tempo de semivida, pode não conseguir alcançar o alvo e eliciar o efeito desejado. Uma alternativa a esse problema seria ligar esses sensibilizadores a anticorpos, favorecendo ao máximo a seletividade às células tumorais¹⁰⁹.

23.8.1.2 Aplicações da TFD na oncologia

Pele

Na dermatologia, a TFD é empregada no tratamento do câncer de pele não melanocítico (CPNM) e outras doenças inflamatórias e proliferativas não neoplásicas, como psoríase, doença de Darier, sarcoidose e necrobiose lipoídica. Nas últimas décadas, a TFD progrediu de um recurso terapêutico experimental para a primeira opção no tratamento de lesões como queratoses actínicas (QA) e outras lesões superficiais extensas como carcinoma basocelular superficial (CBC) e doença de Bowen (DB)^{139,142}. Na dermatologia, a TFD é realizada principalmente utilizando moléculas precursoras tóxicas da via biossintética do heme, tal como o ácido 5-aminolevulínico (ALA) ou o seu metil éster metil aminolevulinato (MAL). Na pele, essas moléculas são em seguida convertidas em porfirinas fotoativáveis, nomeadamente protoporfirina IX (PpIX)¹⁰. Segundo Braathen e colaboradores²¹, o dano celular e, conseqüentemente, a morte, são então induzidos mediante iluminação da pele com luz azul ou vermelha.

Câncer de pele não melanocítico

O câncer de pele não melanocítico é o tumor maligno cutâneo mais comum (70%) na idade adulta, e seu tratamento deve ser escolhido de

acordo com o tipo clínico, tamanho e localização da lesão. A TFD é uma modalidade terapêutica recente para tratamento do câncer de pele não mela-

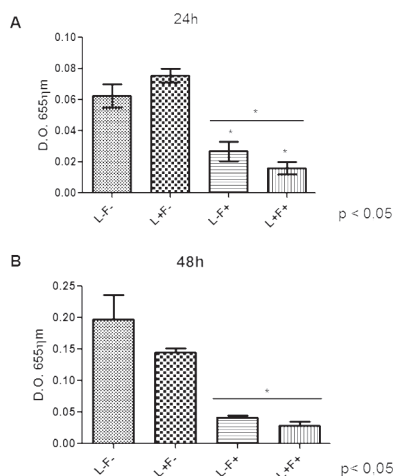


Figura 23.7 Resultados obtidos com o uso da TFD em células de melanoma. (A) Avaliação do crescimento celular em 24 horas. Em comparação ao grupo controle 24 horas, é possível observar a redução significativa nos grupos L-F+ e L-F+. (B) Avaliação do crescimento celular em 48 horas. Em comparação ao grupo controle 48 horas, é possível observar a redução significativa nos grupos L-F+ e L-F+.

nocítico e pode ser considerada a primeira escolha em alguns casos⁵⁸.

Souza e colaboradores¹⁷⁰ testaram o ALA-TFD em 20 pacientes com lesões basocelular, câncer não melanocítico com elevada incidência e doença de Bowen. Após 60 meses houve redução das lesões tumorais de 91,2% para 57,7%, demonstrando, portanto, a eficácia da ALA-TFD na redução das lesões. No entanto, os autores recomendam o uso da ALA-TFD em sessões repetidas para minimizar a recorrência das lesões.

Câncer de pele melanocítico ou melanoma

O melanoma cutâneo é uma lesão maligna que acomete os melanócitos, células produtoras de melanina, substância responsável pela coloração e defesa da pele contra a radiação ultravioleta. O tumor pode se desenvolver em qualquer área do corpo, tendo maior incidência nas áreas expostas à radiação solar, além das mucosas, globo ocular e leptomeninge¹²⁷.

Em seus estudos, Santos¹⁵⁷ analisou os efeitos do *laser* de baixa potência no crescimento celular e comportamento quimiotáxico em células de murinos com melanoma. Os resultados mostram que o *laser* de baixa potência com o comprimento de λ 660 nm, nos tempos de 48 horas e 72 horas, não promoveu mudanças no metabolismo celular; porém, houve alteração do comportamento quimiotáxico quando essas células foram irradiadas com um comprimento de onda mais alto.

Powell e colaboradores¹⁴² compararam os efeitos de diferentes doses de *laser* (λ 780 nm, λ 830 nm e λ 904 nm) em células de melanoma cultivadas em laboratório. Após as irradiações, as células não apresentaram alterações na taxa de proliferação nos diferentes tratamentos, resposta semelhante à obtida por Santos¹⁵⁷.

A Figura 23.7 mostra resultados obtidos com a técnica em células de melanoma.

Cabeça e pescoço

A incidência de câncer de cabeça e pescoço é elevada e tende a aumentar com a idade. Carcinoma de células escamosas é um dos carcinomas mais comuns em cabeça e pescoço. Os carcinomas de boca e orofaringe são classificados como o sexto câncer mais comum no mundo⁶⁰.

O tratamento básico para os vários tipos de câncer bucal consiste na eliminação dos tecidos neoplásicos através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma associação dessas três modalidades terapêuticas. A escolha da modalidade terapêutica depende da extensão, estadiamento tumoral, relação com estruturas anatômicas anexas, envolvimento de cadeia linfática, idade e cooperação do paciente, além do subtipo histológico de lesão⁷³. Em seus estudos, Karakullukcu e colegas⁷⁵ analisaram o uso da TFD em 170 pacientes com lesões de resultantes do câncer bucal. A taxa de resposta global dos pacientes foi de 90,7%, demonstrando que a TFD apresenta resultados favoráveis no tratamento de câncer bucal.

Papini e colegas¹¹⁹ estudaram a eficácia do ultrassom guiada por ablação a *laser* para tratamento não cirúrgico de metástases cervicais. Para tanto, os autores utilizaram a técnica de ultrassom guiada a *laser* em cinco pacientes e fizeram análises de tireoglobulina e alterações de linfonodos durante 12 meses. Ao final, houve redução dos linfonodos que estavam metastáticos, e em 60% dos pacientes não foi detectada a tireoglobulina. Portanto, a técnica de ultrassom guiada a *laser* de ablação pode ser utilizada no lugar de

cirurgias. No entanto, em longo prazo, estudos para controle da doença são necessários.

Pulmão

A atuação da TFD em neoplasias no pulmão foi um dos primeiros sucessos clínicos da técnica. Atualmente, após mais de trinta anos de experiência clínica e progresso técnico, parece claro que uma ampla variedade de lesões pulmonares malignas podem ser erradicadas ou reduzidas por TFD. Várias publicações revisadas demonstraram a eficácia da TFD para lesões endobrônquicas obstruindo, fase inicial, e endobrônquica minimamente invasiva tumores e, em particular, *in situ* e lesões de displasia. Tumores periféricos e pleurais também têm sido tratados com TFD através de intervenções assistidas por vídeo (VATS) ou colocação de cateteres guiada por CT⁴.

Endo e colegas⁴⁴ trataram 48 pacientes medicamente operáveis com câncer nos brônquios com comprimentos de tumor longitudinais menores ou iguais a 10 milímetros com TFD entre 1994 e 2006. Uma resposta completa foi alcançada em 94% dos pacientes, e as taxas de sobrevida global de cinco anos e de dez anos para a coorte foram de 81% e 71%, respectivamente.

Usuda e colegas¹⁸² utilizaram a TFD com o fotossensibilizador NPe6 no tratamento de câncer de pulmão. Os autores concluíram que a TFD com NPe6 produz morte tumoral eficaz em tumores grandes e profundos, invasivos, que foram reduzidos por eletrocautério. Caso contrário, as lesões não seriam normalmente passíveis de tratamento adequado com TFD.

Esôfago

Em seus estudos, Bronner e colegas²² avaliaram a ocorrência de proliferação de células escamosas em pacientes com displasia de alto grau no esôfago tratados com TFD. Ao final das análises histológicas, não foi detectada proliferação celular. Portanto, a TFD pode ser utilizada no tratamento de pacientes com displasia de alto grau.

Cérebro

A seletividade da absorção de fotossensibilizadores em tumores cerebrais malignos, chamados de gliomas, tem atraído ao longo dos últimos vinte anos mais interesse; porém, a evidência de que a adição de TFD após ressecção cirúrgica desses tumores pode melhorar significativamente a sobrevivência é limitada. No entanto, a administração do agente fotossensibilizante ALA, antes da cirurgia, para identificar as margens do tumor através da fluorescência é melhor do que dentro do tumor, pois internamente a fluorescência é menor. Isso faz com que a ressecção do tumor seja mais completa, mas, infelizmente, não tem mostrado aumentar o tempo de sobrevivência^{5,21,61}. Estudos *in vitro* demonstraram resultados promissores quando utilizaram o ALA como agente fotossensibilizador na dose entre 80 J/cm² e 100 J/cm² com λ 660 nm¹⁸².

A técnica preferencialmente sugerida é a realização da TFD através de um cateter com fibra óptica, sendo necessário administrar previamente um fotossensibilizador ao paciente e esperar tempo suficiente para o agente impregnar seletivamente as células tumorais. O cateter com a fibra é fixado no tecido cerebral cirurgicamente. A primeira dose de TFD é dada na sala de recuperação, sendo aplicada a dose de 100 J/cm² para a periferia da cavidade do tumor. Foi utilizado o *laser* de diodo, com um comprimento de onda de λ 630 nm. Mais doses de TFD podem ser dadas à beira do leito nos dias subsequentes. Essa técnica fora do centro cirúrgico proporciona um tratamento mais fracionado e com menos custos ao paciente que, segundo o estudo, o tratamento com cinco aplicações consecutivas mais a administração de dexametasona durante três dias para evitar o edema cerebral.

Bexiga

O carcinoma superficial de bexiga é geralmente tratado pela ressecção transuretral. No entanto, esse tratamento é marcado por uma taxa de recorrência de até 70%, razão pela qual é intensa a busca por uma modalidade de tratamento eficaz na erradicação confiável das células tumorais. A TFD tem sido estudada como tratamento alternativo para o câncer de bexiga, porém é mais indicada para o tratamento dos casos superficiais, pois alguns estudos mostraram que a utilização na mucosa da bexiga é contraindicada por causar contração. O fotossensibilizante Hexvix[®] tem se mostrado menos penetrante, não alcançando a mucosa e sendo muito promissor. O propósito da TFD no tratamento do câncer de bexiga é duplo: erradicação dos focos

visíveis e invisíveis e prevenção de recorrência após procedimento cirúrgico para remoção do tumor^{9,49,57}.

Próstata

O uso da terapia fotodinâmica para o tratamento do câncer da próstata irá requerer que todo o tecido glandular, tanto o normal como o maligno, seja extirpado, para que se obtenha o sucesso. A introdução de um fotossensibilizador que atua apenas sobre a região vascular representa uma mudança no paradigma da TFD, pois a meta nesse caso não é matar as células tumorais diretamente, mas sim os seus vasos sanguíneos. Os fotossensibilizadores mais utilizados em estudos com câncer de próstata são os derivados da hematoporfirina^{114,115}.

O efeito citotóxico desta modalidade terapêutica é obtido quando a fonte de energia *laser* incidente, através de fibras ópticas orientadas por punção na região perineal, chega à próstata fotossensibilizada. Os efeitos colaterais são poucos e estão relacionados à punção local, causando hematúria e incontinência urinária^{15,144}.

Pâncreas

O carcinoma de células pancreáticas é o tipo mais comum de câncer de pâncreas. Alguns estudos demonstraram a viabilidade do mTHPC como fotossensibilizador, na dosagem de 0,15 mg/Kg, na TFD para câncer de pâncreas utilizando fibras de luz percutâneas. Estudos revelam que a TFD pode ser uma boa alternativa para tratamento, devido à necrose completa observada apenas com a dose mais elevada de luz, porém a rápida progressão do tumor dificulta maiores estudos. O uso da TFD para esse tipo de câncer provavelmente será bem-sucedido como terapia adjuvante¹⁵⁵.

Fotoquimioterapia antimicrobiana

A fotoquimioterapia, assim como a TFD, envolve a produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio, produzindo danos às células dos micro-organismos¹⁵¹. Primeiramente, a demonstração dos efeitos da TFD sobre micro-organismos foi realizada por Raab, em 1900, que publicou

um artigo no qual descrevia os efeitos fotodinâmicos no micro-organismo unicelular conhecido como *Paramecium caudatum* quando este era submetido ao corante acridina, juntamente com a luz, ocasionando a morte desse micro-organismo.

Bactérias gram-positivas e gram-negativas reagem diferentemente à TFD. Em bactérias gram-positivas, a porção externa da parede celular é relativamente mais porosa, permitindo aos fotossensibilizadores neutros ou aniônicos a vinculação mais eficiente e a difusão para locais sensíveis da célula⁹⁹. As bactérias gram-negativas foram inicialmente consideradas resistentes à TFD, uma vez que fosfolipídeos, lipoproteínas e polissacarídeos complexos presentes na membrana externa de bactérias como *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *K.pneumonia* e *H.influenza* podem inibir a ligação das moléculas de FS aniônicos^{99,112}, a menos que estratégias adicionais sejam utilizadas de forma a facilitar o seu transporte através da membrana celular³⁷.

Dentre as estratégias que facilitam o transporte do FS através da membrana de bactérias gram-negativas destacam-se o uso de um FS não carregado (a exemplo da deuteroporfirina e da protoclorofila), de um FS carregado positivamente ou catiônico (a exemplo de azul de toluidina O, azul de metileno, substitutos de tetracatiônicos de porfirina, catiônicos ftalocianinas) ou o uso de um FS combinado com peptídeos da membrana¹¹³. O FS catiônico é o ideal contra células bacterianas, pois sua taxa de absorção em tais células é muito maior do que para as células de mamíferos⁶⁶.

Carvalho²³ avaliou *in vitro* o efeito antibacteriano do *laser* diodo (GaAlAs, λ 650 nm, 8 J/cm², 50 mW, ϕ = 0,1 cm², *Laserline*®), associado à substância fotossensível azul de toluidina, sobre as bactérias de úlceras cutâneas infectadas, e observou que houve redução significativa das unidades formadoras de colônias (UFC) quando submetidas à TFD.

Dobson e Wilson¹⁹¹ analisaram a redução bacteriana por fotoinativação de biofilme formado pelas espécies *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actynomicetecomitans*. Para isso, foi utilizada uma associação de diversos corantes e *laser* de HeNe de 7,3 mW de potência, sobre amostras de biofilme em placa de petri. Os autores observaram que os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram eficazes em eliminar as quatro espécies de bactérias, e os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio e hematoporfirina éster não foram tão efetivos. Segundo os resultados, a técnica da terapia fotodinâmica antimicrobiana pode ser efetiva em eliminar bactérias periodontopatogênicas da placa bacteriana.

Burns e colaboradores¹⁹² verificaram a fotoinativação de bactérias cariogênicas associando o AIPcS₂ ao *laser* diodo de GaAlAs. Foram

observadas reduções de aproximadamente 10^6 UFC para *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *A. viscosus*, não sendo encontrado efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias quando elas foram expostas somente à luz *laser* ou ao fotossensibilizador.

Soukos et al.¹⁶⁸ avaliaram os efeitos da TFD utilizando o *laser* de baixa intensidade vermelho associado ao corante azul de toluidina sobre queratinócitos orais humanos, fibroblastos e cultura de *S. sanguis*. Segundo os resultados, os autores concluíram que o uso de baixas concentrações de corante e do *laser* provocou a morte bacteriana, sem comprometer a viabilidade dos queratinócitos e fibroblastos.

Tanaka et al.¹⁷¹ avaliaram os efeitos citotóxicos da TFD sobre os neutrófilos do sangue periférico de murinos utilizando diferentes fotossensibilizadores. Cada fotossensibilizador foi testado em uma concentração que exerceu um efeito máximo bactericida sobre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Os autores observaram que a maioria dos neutrófilos foram mantidos viáveis (mais de 80%) após a TFD usando o azul de toluidina ou o azul de metileno, o que sugere que essa terapia pode preservar estas células, enquanto exerce um efeito terapêutico significativo sobre a infecção microbiana localizada.

Tecido ósseo

Guglielmi et al.⁵⁸ investigaram a utilização da TFD como um tratamento alternativo para osteomielite. Foi utilizada uma cepa de *S. aureus* para a indução da osteomielite, que ocorreu em dez dias. Após este período, o tratamento compreendeu a administração intraperitoneal de ácido aminolevulínico (300 mg/kg), e 4 horas após a realização deste procedimento, a área infectada foi irradiada com luz *laser* ($\lambda 635 \pm 10$ nm, 75 J/cm²), entregue via transcutânea por meio de uma fibra óptica colocada na tíbia. Os autores observaram que o ácido aminolevulínico foi eficaz na redução de biofilme no osso, confirmando, assim, seu potencial para o tratamento de osteomielite em modelo animal.

Goto et al.⁵⁷ avaliaram o efeito da TFD em modelo animal de osteomielite utilizando o fotossensibilizador Na-Pheophorbide (Na-Phde). O grupo controle foi tratado com injeção de solução salina tamponada com fosfato, enquanto no grupo experimental, 48 horas após a infecção inicial com *Staphylococcus aureus* na tíbia dos animais, foi injetada intraperitonealmente uma solução de Na-Phde (560 mmol/L). Sessenta minutos depois da

injeção desse fotossensibilizador, a área infectada foi irradiada com luz *laser* (λ 670 nm, 125 mW, 10 minutos, 93,8 J/mm²). O crescimento bacteriano e os exames histológico e radiológico foram avaliados 14 dias após o tratamento inicial. Os autores observaram que a TFD com Na-Phde preveniu significativamente o edema. Além disso, histológica e radiograficamente, foi observada inibição da destruição óssea na região da tíbia.

Tardivo e Baptista¹⁷² avaliaram o efeito de dois protocolos de TFD em osteomielite de pés diabéticos de dois pacientes. No primeiro paciente, a fim de combater a infecção nos tecidos ósseos e moles, uma solução de fenotiazina (uma mistura de 1:1 das soluções de azul de toluidina 2% e azul de metileno a 2%) foi introduzida na fístula, de forma a alcançar o osso subjacente. Em seguida, duas fontes luminosas foram utilizadas sobre as infecções dos tecidos supracitados, as quais deveriam ser tratadas ao mesmo tempo. Cinco minutos após a injeção do FS, a irradiação foi realizada (10 minutos) através da introdução de uma fibra óptica através da fístula, de forma a entregar a luz *laser* (HeNe, λ 632 nm, 5 mW) diretamente no osso, e a irradiação externa do hálux foi realizada com uma fonte de luz policromática não coerente (RL 50, λ 570 nm a 750 nm, 100 mW, 60 J/cm², Φ = 50 mm). O protocolo do segundo paciente foi semelhante ao do primeiro; entretanto, foi utilizada uma mistura 1:1 de hipérico (10% de propileno glicol e 2% de azul de metileno), sendo a irradiação interna (osso) realizada com luz branca não coerente (TransLux III; Kulzer, São Paulo, Brazil; 7 mW) e a externa com luz policromática não coerente, conforme o protocolo do primeiro paciente. De acordo com os autores, ambos os protocolos foram efetivos no manejo da osteomielite em pés diabéticos, sendo demonstrado por meio de radiografias áreas evidentes de reparo ósseo.

Tem sido estudado durante muitos anos que o osso normal é relativamente resistente a TFD, e muitos estudos estão na fase *in vitro* ou animal, de modo que não há nada concreto no tratamento de doentes humanos com câncer ósseo ou com metástase óssea. Alguns estudos relataram o aumento da sobrevida quando realizada a TFD em metástase óssea ou osteossarcoma, porém também relataram que para as metástases ósseas será importante estudar melhor a colocação de fibras na coluna vertebral^{35,42}.

Câncer de mama

Estudos com a TFD no câncer de mama mostraram que a seleção de pacientes para o uso da terapia se deu a partir de critérios como não

responder à quimioterapia ou à radioterapia, devido à grande extensão do local do tumor, ou ser inelegível para cirurgia. O carcinoma de mama recorrente sugere que a terapia fotodinâmica parece ser um valioso complemento aos tratamentos clássicos. Os riscos potenciais da terapia são baixos, não há influência sobre a qualidade de vida e não ocorre promoção de metástases^{114,115}.

Em estudos realizados por Montazerabadi^{105,106}, foi demonstrada a eficácia do mitoxantrona, um agente antineoplásico, como fotossensibilizante na terapia fotodinâmica em uma linhagem celular de tumor de mama em humanos (MCF-7). Esse estudo comparou diferentes concentrações de mitoxantrona com diferentes doses de luz. Conclui-se que numa concentração relativamente baixa do antineoplásico, 5 μM , associada com 30 J/cm^2 de luz no comprimento de onda de λ 660 nm, ocorreu a morte significativa das células tumores MCF-7, mostrando o potencial desse antineoplásico como fotossensibilizador na TFD nos tumores de mama. Porém, muitos estudos ainda estão em andamento.

Condições pré-malignas da genitália e regiões pélvicas

A neoplasia intraepitelial (alterações pré-cancerosas que podem evoluir para cancro invasivo) da vulva, vagina, colo do útero, do pênis e da região perianal está muitas vezes relacionada com a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) ou vírus da imunodeficiência humana (HIV). Muitas vezes ocorre o desenvolvimento de áreas sensíveis e lesões doloridas e desconfortáveis, tendo um grande potencial para a TFD⁹⁰.

O estudo realizado por Trushina¹⁸⁰ teve como objetivo avaliar a eficácia da TFD no colo do útero, utilizando o fotossensibilizador Photogem[®] em pacientes com lesões pré-cancerosas e câncer cervical não invasivo. O Photogem[®] foi administrado por via intravenosa 48 horas antes da irradiação do tumor a uma dose de 2,5 mg/kg a 3,0 mg/kg, densidade de energia da irradiação *laser* de 150-200 J/cm^2 e densidade de potência de 150 mW/cm^2 a 250 mW/cm^2 . A irradiação foi realizada através da utilização de uma fibra óptica com iluminação direta em uma das extremidades; posteriormente, a complementação foi realizada através da utilização de uma fibra cilíndrica difusora. No retorno após 40 dias da TFD, as pacientes estavam sem lesões de vulva, vagina ou colo de útero (colposcopia alargada), não havia cicatriz e a elasticidade da vagina estava totalmente preservada. A TFD se mostrou eficaz para esse tipo de aplicação, principalmente se os históricos

clínicos das pacientes forem de ciclos de tratamento químico sem resultados satisfatórios.

Um dos avanços recentes da prática clínica com essa terapia é o desenvolvimento de *lasers* de diodo, equipamentos que se encontram altamente disponíveis e compatíveis para os fotossensibilizadores atualmente utilizados, tornando o procedimento ainda mais simples e barato. Esses *lasers* apresentam excelentes vantagens, pois são pequenos, podem ser facilmente transportados, são bastante fiáveis e não requerem um sistema de refrigeração externo. A TFD não é indicada no caso de tumores grandes, profundos ou disseminados, porque a penetrabilidade da luz monocromática utilizada até então não é capaz de penetrar além de 1 cm no tecido^{128,145}.

Muitos estudos estão sendo realizados em diversas especialidades oncológicas, porém os cânceres de pele, de cérebro e condições pré-malignas da genitália e regiões pélvicas apresentam estudos mais avançados com relação ao uso da TFD, principalmente como terapia adjuvante. As maiores dificuldades que os pesquisadores relatam é na determinação da dosagem e na escolha do fotossensibilizador, dois fatores que são cruciais ao sucesso terapêutico. O câncer de pele apresenta maiores pesquisas e melhores resultados pela sua facilidade de aplicação do fotossensibilizador e da irradiação do *laser*; já para cânceres de cérebro e de próstata, por exemplo, há a necessidade de utilização de fibras óticas para que a luz chegue à região fotossensibilizada, podendo este ser um empecilho na rotina hospitalar^{114,115}. Os efeitos colaterais são poucos e estão relacionados à região aplicada, no caso da próstata, por exemplo, causando hematúria e incontinência urinária, porém rapidamente resolvidos^{15,144}. Os riscos potenciais da terapia são baixos, não há influência sobre a qualidade de vida e não ocorre promoção de metástases. A TFD se mostrou eficaz para esse tipo de aplicação, principalmente se os históricos clínicos dos pacientes forem de ciclos de tratamento químico sem resultados satisfatórios^{97,125}.

No Brasil, assim como em países como Canadá, Alemanha, Estados Unidos, França e Japão, já existem protocolos clínicos para tratamento dos mais diversos tipos de tumores, porém a terapia ainda é pouco empregada na prática clínica¹³². Os estudos aqui demonstrados têm mostrado que a TFD pode ser considerada uma opção interessante no tratamento de lesões de pele pré-malignas não melanoma e para o tratamento de esôfago de Barrett e colangiocarcinoma irressecável. Já com relação à TFD em outros tumores, ainda restam desconfianças por parte dos clínicos quanto ao tratamento, uma vez que a análise da eficácia depende muito da observação, em vez de poder ser constatada por estudos devidamente controlados e randomizados,

com uma padronização unificada. Por essa razão, a terapia é oferecida apenas em um pequeno número de centros especializados^{128,145}.

Poucos esforços têm sido empreendidos no nosso país no sentido de estimular a pesquisa e o desenvolvimento nessa modalidade terapêutica, assim como, conseqüentemente, sua aplicação, embora se deva reconhecer que esse é um tema de pesquisa de grande interesse estratégico.

Podemos observar que as potencialidades da TFD no tratamento do câncer são imensuráveis, porém, o maior desafio em curto prazo é realizar ensaios clínicos para que fiquem cada vez mais claros os benefícios que essa terapia pode trazer. Como a medicina atual está baseada em evidências, é preciso apresentar estudos que convençam os profissionais de saúde e tragam informações relevantes sobre a eficácia, segurança, e papel significativo que essa terapia pode desempenhar nas condições tumorais, seja como co-terapia ou mesmo substituindo a convencional. Infelizmente, ensaios clínicos requerem tempo e dinheiro, embora já existam fotossensibilizadores disponíveis para esses ensaios e sistemas de emissão de luz de fácil acesso e baixo custo. Apesar dessa dificuldade, essa modalidade terapêutica tem encontrado caminho nas mais diversas áreas da medicina, sendo hoje a terapia de escolha em câncer de pele (não melanoma), encontrando-se em expansão. Outro foco das pesquisas tem se voltado para o desenvolvimento de fotossensibilizadores mais específicos, veículos e tecnologias de entrega da luz, favorecendo ainda mais a seletividade e potencialidade dessa terapia, para que então essa técnica possa ser expandida e aplicada aos mais diversos tipos de câncer.

23.9 CONCLUSÕES

A tecnologia que se serve de diversos tipos de luz encontra-se atualmente em praticamente todas as áreas de pesquisa científica e tecnológica. Inicialmente, o maior número de aplicações do *laser* efetivou-se na ciência de materiais (deposição de filmes finos). Através de modificações como a duração dos pulsos, novos comprimentos de onda e diversos tipos de *lasers*, estes se popularizaram em outras áreas, como a biologia, a medicina e a biotecnologia.

Na área biológica, por exemplo, o *laser* pode ser utilizado na contagem e identificação de células hematológicas pelo seu tamanho e complexidade (hemograma); ou na identificação imunofenotípica por citometria de fluxo; quantificação de sequências de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real; tomografia celular, microdissecção de amostras,

localização de moléculas e células, bem como quantificação de compostos e biofilmes celulares por microscopia confocal.

Na medicina, o *laser* encontra várias aplicações. Os cirurgiões valem-se do feixe fino de luz que se concentra em quantidades significativas de energia em uma pequena região como bisturi nas cirurgias, uso em que o *laser* mostra eficiência associada ao fato de evitar contaminação por micro-organismos e sangramento das porções seccionadas. Usando o *laser*, os oftalmologistas tratam o afrouxamento da retina, uma causa frequente de cegueira. Outra fototerapia é o tratamento clínico que emprega a combinação de luz, oxigênio e um composto fotossensibilizador (FTS): a terapia fotodinâmica (TFD), usada no tratamento de uma variedade de patologias de caráter oncológico, cardiovascular, dermatológico, oftálmico ou microbiológico.

Na biotecnologia, as fototerapias auxiliam vários processos, sendo a espectroscopia Raman uma importante ferramenta analítica e de pesquisa cujas aplicações incluem o monitoramento da produção de carotenoides a partir da levedura *Phaffia rhodozyma*; determinação de concentrações de glicose, de acetato, de lactato e fenilalanina em biorreatores de crescimento de *E. coli*; e na determinação da concentração de nitrito e nitrato no monitoramento de bioprocessos em reatores para tratamento de águas residuais.

Como forma de alavancar as atividades industriais, e não só, foi possível uma rápida diferenciação de colônias de bactérias na base de padrões de difração da luz *laser* e análise da imagem. Já foi descrito um método óptico biotecnológico que transforma a energia da luz *laser* em calor para controlar a expressão de uma variedade de genes. Na indústria cervejeira, a tecnologia *laser* é usada na detecção dos micro-organismos deteriorantes da cerveja. Por sua vez, a aplicação da luz emitida por diodo (LED) tem sido utilizada para aumentar o rendimento de bioprocessos. Nesse caso, a utilização de determinados comprimentos de onda na faixa do espectro vermelho e de outra do infravermelho melhora a permeabilidade da membrana celular da levedura, favorecendo as trocas metabólicas, acelerando o consumo do açúcar e aumentando a produção de etanol. Outrossim, a aplicação de LED também permite monitorar em tempo real o consumo de substratos e a sua transformação em etanol, o que extrapola o uso dessa forma de energia para outras aplicações industriais.

Na fototerapia utiliza-se uma luz emitida por diodo (LED) ou a amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (*laser*). Sendo formas de emissão luminosa, o *laser* e o LED estão englobados dentro do espectro eletromagnético, ocupando as faixas destinadas à luz visível e luz infravermelha.

O LED não emite luz monocromática, coerente ou colimada, mas consiste de uma banda espectral relativamente estreita e é produzida pelas interações energéticas do elétron. As vantagens da utilização do LED são a eficiência similar no tratamento de diversas patologias de pele, cicatrização de feridas e reparo tecidual, além da longa durabilidade, baixo custo, não geração de calor, alta eficiência energética e dimensões reduzidas.

A fototerapia *laser* é uma modalidade de tratamento não invasiva, que vem sendo amplamente utilizada no controle das mais diversas afecções. Suas características peculiares e que lhe conferem maior aplicabilidade são o fato de ser coerente, monocromática e altamente colimada. Dentre os efeitos terapêuticos encontram-se o anti-inflamatório, analgésico e modulador da atividade celular, os quais têm sido comprovados em diversos estudos.

23.10 PERSPECTIVAS FUTURAS

As aplicações de fontes luminosas, em particular *lasers* e LEDs, possuem um potencial enorme na área da biotecnologia. Como demonstrado ao longo deste capítulo, as fontes de luz estão sendo estudadas em diversas áreas da saúde e biológicas, quer como agentes terapêuticos quer como métodos de diagnóstico. Vislumbramos algumas possíveis aplicações futuras que poderão ser inestimáveis para a biotecnologia. Dentre estas, destacam-se: o monitoramento ambiental; o monitoramento espectral de micro-organismos, insetos, e pestes agrícolas; avaliação da maturação de frutas, verduras e legumes; o diagnóstico espectral de doenças; e na área de exploração de petróleo e na recuperação de poços maduros.

REFERÊNCIAS

1. Aciole JMS, Castro ICV, Soares LGP, Barbosa AF, Aciole GT, Silveira L Jr., Pinheiro AL. Assessment of the LED phototherapy on femoral bone defects of ovariectomized rats: a Raman spectral study. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(3):1269-77.
2. Agostinis P, Berg K, Cengel K, Foster T, Girotti A, Gollnick S, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2011;61(4):250-81.
3. Akilov O, Kosaka S, O'Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte T, et al. The Role of Photosensitizer Molecular Charge and Structure on the Efficacy of Photodynamic Therapy against Leishmania Parasites. *Chemistry & Biology.* 2006;13(8):839-47.
4. Allison R, Moghissi K, Downie G, Dixon K. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnosis and photodynamic therapy.* 2011;8(3):231-9.
5. Ampil F, Caldito G, Milligan S, Mills G, Nanda A. The elderly with synchronous non-small cell lung cancer and solitary brain metastasis: Does palliative thoracic radiotherapy have a useful role? *Lung Cancer.* 2007;57(1):60-5.
6. Arruda E, Rodrigues N, Taciro C, Parizotto N. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Revista Brasileira de Fisioterapia.* 2007;11(4):283-8.
7. Rasouli Ghahroudi AA, Rokn AR, Kalhori KA, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro AL, Fekrazad R. Effect of low-level *laser* therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci.* 2013.
8. Assis TO, Soares MS, Victor MM. O uso do *laser* na reabilitação das desordens temporomandibulares. *Fisioterapia em Movimento.* 2012;25(2):453-9.
9. Aysan N, Topaloglu N, Yuksel S, Gulsoy M. Biostimulative effect of 809-nm diode *laser* and indocyanine green on *p. aeruginosa* instead of photodynamic therapy. *Proc. SPIE 8569, Mechanisms for Low-Light Therapy VIII, 85690D (March 5, 2013).*
10. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photochem Photobiol Photomed.* 2010;26(3):118-32.
11. Bader M, Stepp H, Beyer W, Pongratz T, Sroka R, Kriegmair M, et al. Photodynamic therapy of bladder cancer – a phase I Study Using Hexaminolevulinat (HAL). *Urol Oncol.* 2013;31(7):1178-83.
12. Baldan C, Marques A, Schiavinato A, Casarotto R. The effects of different doses of 670 nm diode *laser* on skin flap survival in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2012;27(2):155-6.
13. Barbosa A, Soares L, Aciole J, Aciole G, Pitta I, Galdino S, et al. Evaluation of Photodynamic Antimicrobial Therapy (PACT) against Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: In Vitro Study. *AIP Conf. Proc.* 2011;1364(1):55.

14. Barbosa A, Sangiorgi B, Galdino S, Barral-Netto M, Pitta I, Pinheiro A. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2012;44(10):850-5.
15. Barbosa R, Marcolino A, de Jesus Guirro R, Mazzer N, Barbieri C, Fonseca M. Efeito do *laser* de baixa intensidade (660 nm) na regeneração do nervo isquiático lesado em ratos. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2010;17(4): 294-9.
16. Barbugli PA. Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2010.
17. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology Semin. Cutan. Med. Surg. 2008; 27(4) 227–38.
18. Barolet D, Boucher A, Bjerring P. In vivo human dermal collagen production following LED-based therapy: the importance of treatment parameters. *Lasers Surg Med*. 2005;17:76.
19. Barolet D, Roberge CJ, Auger FA, Germain L. Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study *J Investig Dermatol*. 2009;129(12):2751–9.
20. Bozzini G, Colin P, Betrouni N, Maurage C, Leroy X, Simonin S, et al. Efficiency of 5-ALA mediated photodynamic therapy on hypoxic prostate cancer: A preclinical study on the Dunning R3327-AT2 rat tumor model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(3):296-303.
21. Braathen L, Morton C, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Gerritsen M, Gilaberte Y, et al. Photodynamic therapy for skin field cancerization: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012;26(9):1063-6.
22. Bronner M, Overholt B, Taylor S, Haggitt R, Wang K, Burdick J, et al. Squamous overgrowth is not a safety concern for photodynamic therapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastroenterology*. 2009;136(1):56-64.
23. Carvalho JM; Flores CAT; Freitas JS. Aplicação do Diodo Emissor de Luz Infravermelha no tratamento da dor fibromiálgica. *Revista Dor*. 2009; 10(4):331-6.
24. Casara C, Eidt L, Cunha V. Estudo de prevalência das dermatoses encaminhadas ao setor de fototerapia do ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2013;88(2):211-5.
25. Castro IC, Rosa CB, dos Reis Júnior JA, Moreira LG, Aragão JS, Barbosa AF, et al. Assessment of the use of LED phototherapy on bone defects grafted with hydroxyapatite on rats with iron-deficiency anemia and nonanemic: a Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(5):1607-15.
26. Chin W, Heng P, Thong P, Bhuvaneswari R, Hirt W, Kuenzel S, et al. Improved formulation of photosensitizer chlorin e6 polyvinylpyrrolidone for fluorescence

- diagnostic imaging and photodynamic therapy of human cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;69(3):1083-93.
27. Choudhary S, Keyvan N, Elsaie LM. *Lasers* Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci*. 2009;24:971-80.
28. Costa Lino MDM, Carvalho FB, Moraes MF, Cardoso JA, Pinheiro ALB, Ramalho LMP. The effects of photobiomodulation on healing of bone defects in streptozotocin induced diabetic rats. *Proceedings SPIE 7887, Mechanisms for Low-Light Therapy VI*; 2011 fev 17;6:78870G.
29. Couto JPA. Análise comparativa da terapia com LED (640±20nm) e *laser* (660nm) sobre o processo de reparação cutânea em ratos idosos [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2009.
30. Cremonese CCK. Tecnologias limpas aplicadas à otimização de processo de identificação de *Candida spp.* por espectroscopia no infravermelho [Dissertação de mestrado]. Santa Cruz do Sul: Universidade de Santa Cruz do Sul; 2013.
31. Cristescu R, Popescu C, Dorcioman G, Miroiu F, Socol G, Mihailescu I, et al. Antimicrobial activity of biopolymer--antibiotic thin films fabricated by advanced pulsed *laser* methods. *Applied Surface Science* 2013;278:211-3.
32. Croft S, Oliaro P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clinical microbiology and infection*. 2011;17(10):1478-83.
33. Cury V, Moretti A, Assis L, Bossini P, de Souza Crusca J, Neto C, et al. Low level *laser* therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013;125:164-70.
34. Dai T, De Arce V, Tegos G, Hamblin M. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(12):5710-7.
35. Debta F, Ghom A, Debta P, Deoghare A. Photochemotherapy (PUVA): An Overview. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine & Radiology*. 2010;22(3):141-3.
36. Demidova T, Hamblin M. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(6):2329-35.
37. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic Therapy Targeted To Pathogens. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2004;17(3):245-54.
38. Diamond I, Granelli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB, Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant turnours. *Lancet*. 1972; 2(7788):1175-7.
39. Dourado K, Junior L, de Paulo R, Gomes A, Cavallieri R. LEDterapia. Uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. 2011;15(6):231-48.

40. Dovigo L, Pavarina A, Ribeiro A, Brunetti I, Costa C, Jacomassi D, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochemistry and Photobiology*. 2011;87(4):895-903.
41. Dutta S, Ongarora B, Li H, Maria da Graça H, Kolli B, Chang K. Intracellular targeting specificity of novel phthalocyanines assessed in a host-parasite model for developing potential photodynamic medicine. *PLoS One*. 2011;6(6):20786.
42. Egli R, Schober M, Hempfing A, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Sensitivity of osteoblasts, fibroblasts, bone marrow cells, and dendritic cells to 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2007;89(2):70-7.
43. Eljamel M. Photodynamic assisted surgical resection and treatment of malignant brain tumours technique, technology and clinical application. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004;1(1):93-9.
44. Endo C, Miyamoto A, Sakurada A, Aikawa H, Sagawa M, Sato M, et al. Results of long-term follow-up of photodynamic therapy for roentgenographically occult bronchogenic squamous cell carcinoma. *CHEST Journal*. 2009;136(2):369-75.
45. Esmaeelinejad M, Bayat M, Darbandi H, Bayat M, Mosaffa N. The effects of low-level *laser* irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. *Lasers Med Sci*. 2014;29(1):121-9.
46. Fahmy IR, Abu-Shady H. The isolation and properties of ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in the treatment of leukoderma. *Quarterly journal of pharmacy and pharmacology*. 1948;21(4):499-503.
47. Fekrazad R, Bargrizan M, Sajadi S, Sajadi S. Evaluation of the effect of photoactivated disinfection with Radachlorin® against *Streptococcus mutans* (an in vitro study). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011;8(3):249-53.
48. Fink L, Holschermann H, Kwapiszewska G, Muyal J, Lengemann B, Bohle R, et al. Characterization of platelet-specific mRNA by real-time PCR after *laser*-assisted microdissection. *Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart*. 2003;90(4):749-56.
49. Frare JC, Nicolau RA. Análise clínica do efeito da fotobiomodulação *laser* (GaAs-904nm) sobre a difusão temporomandibular. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. 2008;12:37-42.
50. Funayama T, Tsukanishi T, Hara I, Ozeki E, Sakane M. Tumor-selective near-infrared photodynamic therapy with novel indocyanine green-loaded nanocarrier delays paralysis in rats with spinal metastasis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(4):374-8.
51. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin M. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(6):2173-8.

52. Gama SKC, Habib FAL, de Carvalho JSM, et al. Tooth Movement After Infrared *laser* Phototherapy: Clinical Study in Rodents. *Photomedicine and laser Surgery*. 2010;28: S79-83.
53. Gerbi ME. Avaliação da eficácia do *laser* de 830nm no reparo ósseo de feridas cirúrgicas associadas ou não a implante de proteínas morfogenéticas ósseas e membrana biológica. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Odontologia. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2004.
54. Gerbi ME, Limeira Júnior FA, Pinheiro ALB, et al. Assesment of bone repair associated to the use of organic bone graft and membrane with 830nm. *SPIE Lasers in Dentistry*. 2003;4950:137-43.
55. Gerbi ME, Marques AMC, Ramalho LMP, Ponzi EAC, Carvalho CM, Santos RC, et al. Infrared *Laser* Light Further Improves Bone Healing When Associated With Bone Morphogenetic Proteins: An in Vivo Study in a Rodent Model. *Photomed Laser Surg*, 2008;26(1):55-60.
56. Gerbi ME, Pinheiro ALB, Marzola C, et al. Assessment of Bone Repair Associated with the use of Organic Bovine Bone and Membrane Irradiated at 830nm. *Photomed. Laser Surg*. 2005;23:382-8.
57. Goto B, Iriuchishima T, Horaguchi T, Tokuhashi Y, Nagai Y, Harada T, Saito A, et al. Therapeutic Effect of Photodynamic Therapy Using Na-Pheophorbide a on Osteomyelitis Models in Rats. *Photomed Laser Surg* 2011;29(3):183-9.
58. Guglielmi CA, Simionato MR, Ramalho KM, Imparato JC, Pinheiro SL, Luz MA. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Optics*. 2011;16(8) 088003.
59. Sánchez Gómez A, Reza Goyanes M, Callejo Velasco D, Blasco Amaro JA. Efectividad, seguridad y coste-efectividad de la terapia fotodinámica en el tratamiento de cáncer de esófago y esófago de Barrett. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, Agencia Laín Entralgo; 2009. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: UETS 2007/13.
60. Gondim FM, Gomes IP, Firmino F. Prevenção e Tratamento da Mucosite Oral. *Revista de Enfermagem*. 2010;18(1):67-74.
61. Grossman H, Gomella L, Fradet Y, Morales A, Presti J, Ritenour C, et al. A phase III, multicenter comparison of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy and white light cystoscopy for the detection of superficial papillary lesions in patients with bladder cancer. *The Journal of Urology*. 2007;178(1):62-7.
62. Guarino FM. Micosis fungoide en fase de placas tratada con terapia fotodinamica: resultados en 12 pacientes. *Astas Sermo-Sifiliográficas*. 2010;101(9):785-91.
63. Guarino FM. Terapia fotodinamica en micosis fungoides. *Astas Dermo-Sifiliográficas*. 2012;104(5):393-9.

64. Habib FAL, Gama SKC, Ramalho LMP, et al. Effect of *laser* Phototherapy on the Hyalinization Following Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Photomedicine and laser Surgery*. 2012;30:179-85.
65. Habib FAL, Gama SKC, Ramalho LMP, et al. *laser*-Induced Alveolar Bone Changes During Orthodontic Movement: A Histological Study on Rodents. *Photomedicine and laser Surgery*. 2010;28:823-30.
66. Hall-Stoodley L, William Costerton J, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2:95-108.
67. Hamblin MR, Mroz P. *Lasers in Photodynamic Therapy*. In: Maximilian Lackner, editor. *Lasers in Chemistry*. Weinheim: VCH Wiley Verlag GmbH & Co.; 2008.
68. Hamdoon Z, Jerjes W, Upile T, Hopper C. Optical coherence tomography-guided photodynamic therapy for skin cancer: case study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011;8(1):49-52.
69. Hasegawa GKF. Estudo da Potencialidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) na desinfecção da água [Trabalho de conclusão de curso]. Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2012.
70. Hermann G, Mogensen K, Carlsson S, Marcussen N, Duun S. Fluorescence-guided transurethral resection of bladder tumours reduces bladder tumour recurrence due to less residual tumour tissue in T a/T1 patients: a randomized two-centre study. *BJU International*. 2011;108(8b):297-303.
71. Issa M, Manela-Azulay M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85(4):501-11.
72. Jabłoński MB. Microchemical investigation of bone derived from mice treated with strontium indifferent chemical forms using scanning electron microscopy and micro-Raman spectroscopy. *Microchemical Journal*. 2013;108:168-73.
73. Jerjes W, Upile T, Akram S, Hopper C. The surgical palliation of advanced head and neck cancer using photodynamic therapy. *Clinical Oncology*. 2010;22(9):785-91.
74. Kamoshima Y, Terasaka S, Kuroda S, Iwasaki Y. Morphological and histological changes of glioma cells immediately after 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy. *Neurological Research*. 2011;33(7):739-46.
75. Karakullukcu B, van Oudenaarde K, Copper M, Klop W, van Veen R, Wildeman M, et al. Photodynamic therapy of early stage oral cavity and oropharynx neoplasms: an outcome analysis of 170 patients. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2011;268(2):281-8.
76. Kashef N, Borghei Y, Djavid G. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(2):150-5.

77. Kharkwal G, Sharma S, Huang Y, Dai T, Hamblin M. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2011;43(7):755-67.
78. Simionato M, Ramalho K, Imparato J, Pinheiro S, Luz M. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *Journal of Biomedical Optics*. 2011;16(8): 088003.
79. Khouri V, Stracieri A, Rodrigues M, Moraes D, Pieroni F, Simões B et al. Use of therapeutic *laser* for prevention and treatment of oral mucositis. *Brazilian Dental Journal*. 2009; 20(3):215-20.
80. Karu TI. Low-Power *Laser* Therapy. In: Vodinh T. Biomedical photonics handbook. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 1-25.
81. Karu TI. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 2008;84(5):1091-9.
82. Karu TI, Kalendo GS, Letokhov VS, Lobko VV. Different responses of proliferating and resting tumour cells to pulsed high repetition rate low-intensity *laser* light at 271 nm. *Laser Chemistry* 1983;1(3):153-61.
83. Karu TI, Kalendo GS, Letokhov VS, Lobko VV. Biostimulation of HeLa cells by low intensity visible light. *Il Nuovo Cimento D*. 1982;1(6):828-40.
84. Karu TI, Tiphlova OA, Letokhov VS, Lobko VV. Stimulation of E.coli growth by *laser* and incoherent red light. *Il Nuovo Cimento D*. 1983; 2(4):1138-44.
85. Kranendonk AA, Van der Reijden WA, Van Winkelhoff AJ, Van der Weijden GA. The bactericidal effect of a Genius Nd:YAG *laser*. *Int J Dent Hyg*. 2010;8(1):63-67.
86. Lambrechts S, Aalders M, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(5):2026-34.
87. Leal CT, Bezerra AL, Lemos A. A efetividade do *laser* de HeNe 632,8 nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2012;19(3):290-6.
88. LeBlanc D, Story R, Gross E. *laser*-induced inactivation of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. 2012;11(1):267.
89. Lee JW, Kim BJ, Kim MN. Photodynamic therapy: new treatment for recalcitrant *Malassezia* folliculitis. *Lasers Surg. Med*. 2010; 42(2): 192-6.
90. Li J, Chen Z, Huang Z, Zhan Q, Ren F, Liu J, et al. In vitro study of low intensity ultrasound combined with different doses of PDT: Effects on C6 glioma cells. *Oncology Letters*. 2013;5(2):702-6.
91. Lima A, Antequera R, Peres M, Snitcosky I, Federico M, Villar R. Efficacy of low-level *laser* therapy and aluminum hydroxide in patients with chemotherapy and radiotherapy-induced oral mucositis. *Brazilian Dental Journal*. 2010;21(3):186-92.

92. Lins R, Dantas E, Lucena K, Catao M, Granville A, Neto L. Efeitos bioestimulantes do *laser* de baixa potência no processo de reparo. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85(6):849-55.
93. Longo J, Lozzi S, Azevedo R. Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica. *RGO*. 2011;59:51-7.
94. Lopes CB, Pacheco MTT, Silveira L, et al. The effect of the association of near infrared *laser* therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: A Raman spectroscopic study. *Journal Biomedical Material Research. Part A*. 2010;94:1257-63.
95. Lopes CB, Pinheiro ALB, Sathaiah S, et al. Infrared *laser* Light Reduces Loading Time of Dental Implants: A Raman Spectroscopic Study. *Photomedicine and laser Surgery*. 2005;23: 27-31.
96. Lopes CB, Pinheiro ALB, Sathaiah S, Silva NS, Salgado MAC. Infrared *Laser* Photobiomodulation (λ 830 nm) on Bone Tissue Around Dental Implants: A Raman Spectroscopy and Scanning Electronic Microscopy Study in Rabbits. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007;25(2): 96-101.
97. Lyon J, Rezende R, Rabelo M, de Lima C, Moreira L. Synergic Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Surfactants in the Inhibition of *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2013;175(1-2):159-64.
98. Maclean M, Murdoch L, MacGregor S, Anderson J. Sporicidal Effects of High-Intensity 405 nm Visible Light on Endospore-Forming Bacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 2013;89(1):120-6.
99. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem*. 2009;9(8):947-83.
100. Mang T, Mikulski L, Hall R. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010;7(2):98-105.
101. Martines NS, Machado AHA, Silva NS, Tedesco AC, Zângaro RA, Pacheco-Soares C. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. 2007;36(1):59-64.
102. Meirelles GCS, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro ALB. A Comparative Study of the Effects of *Laser* Photobiomodulation on the Healing of Third-Degree Burns: A Histological Study in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; 26(2):159-66.
103. Meyer P, de Araújo H, Carvalho M, et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. *Fisioterapia Brasil*. 2010;11(6):428-32.
104. Minatel D, Enwemeka C, Francca S, Frade M. Fototerapia (LEDs 660/890nm) no tratamento de úlceras de perna em pacientes diabéticos: estudo de caso. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2009;84 (3):279-83.

105. Montazerabadi A, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi M, Ahmadi A, Shakeri-Zadeh A, Aledavood A. Mitoxantrone as a prospective photosensitizer for photodynamic therapy of breast cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2012;9(1):46-51.
106. Montazerabadi A, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi M, Ahmadi A, Aledavood A. The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012;109:42-9.
107. Mattiello F, Coelho A, Martins O, Mattiello R, Ferrão Júnior J. In vitro effect of photodynamic therapy on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Streptococcus sanguinis*. *Brazilian Dental Journal*. 2011;22(5):398-403.
108. Nagy EM, Dalla Via L, Ronconi L, Fregona D. Recent Advances in PUVA Photochemotherapy and PDT for the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2010;16(16):1863-76.
109. Natal AMD. Influência do pH na interação do Photofrin®, Photogem® e Photosan® com DMPC e lipoproteína de baixa densidade [Dissertação de Mestrado] [Internet]. [Cited 2014 Apr 28]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos; 2007. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/rde-27032008-110609/>.
110. Neves D, Ramos D, Magalhães G, Rodrigues R, Souza J. Terapia fotodinâmica para tratamento de múltiplas lesões no couro cabeludo na síndrome do nevasocelular. Relato de caso. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85(4):545-8.
111. Neves L, Marcolino A, Prado R, Thomazini J. *laser* 830nm na viabilidade do retalho cutâneo de ratos submetidos à nicotina. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2011;19(6):342-5.
112. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol*. 1992;55(1):89-96.
113. Nitzan Y, Pechatnikov I. Approaches to kill gram-negative bacteria by photosensitized processes. In: Hamblin MR, Jori G. *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*. Reino Unido: RSC Publishing; 2011. p. 45-67.
114. Nowak-Stępniewska A, Malecki M, Wiktorska K, Romiszewska A, Padzik-Graczyk A. Inhibition of cell growth induced by photosensitizer PP(Arg)₂-mediated photodynamic therapy in human breast and prostate cell lines. Part I. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011;8(1):39-48.
115. Nowak-Stępniewska A, Wiktorska K, Małeck M, Romiszewska A, Padzik-Graczyk A. Cytotoxicity of PP(Arg)₂- and Hp(Arg)₂-mediated photodynamic therapy and early stage of apoptosis induction in prostate carcinoma in vitro. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(4):497-505.

116. Nucci V, Torchia D, Cappugi P. Treatment of anogenital condylomata acuminata with topical photodynamic therapy: report of 14 cases and review. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14:280-2.
117. Oliveira JR, Duarte DF, Gonçalves LD, Souza FVP, Silva JCO, Silva UTG. Aplicabilidade do *laser* Biospeckle nas Ciências Agrárias. In: II Semana de Ciência e Tecnologia IFMG, II Jornada Científica; 2009 out 19-23; Campus Bambuí.
118. Oliveira F, Pereira V, Trindade A, Shimano A, Gabriel R, Borges A. Ação do *laser* terapêutico e do ultrassom na regeneração nervosa periférica; Action of therapeutic *laser* and ultrasound in peripheral nerve regeneration. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2012;20(2):98-103.
119. Papini E, Bizzarri G, Bianchini A, Valle D, Misischi I, Guglielmi R, et al. Percutaneous ultrasound-guided *laser* ablation is effective for treating selected nodal metastases in papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;98(1):92-7.
120. Park K, Han T, Kim I, Yeo I, Kim B, Kim M. The Effects of 830 nm light-emitting diode therapy on acute herpes zoster ophthalmicus: a pilot study. *Annals of Dermatology*. 2013;25(2):163-7.
121. Patriota R, Rodrigues C, Cucé L. Luz intensa pulsada no fotoenvelhecimento: avaliação clínica, histopatológica e imuno-histoquímica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2011;86(6):1129-33.
122. Peloi L, Biondo C, Kimura E, Politi M, Lonardon M, Aristides S, et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*). *Experimental Parasitology*. 2011;128(4):353-6.
123. Pereira C, Costa A, Carreira C, Junqueira J, Jorge A. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):859-64.
124. Pereira S. Photodynamic therapy for pancreatic and biliary tract cancer: the United Kingdom experience. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2012;10(Suppl 2):48.
125. Perussi J. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*. 2007;30(4):988.
126. Pileggi G, Wataha J, Girard M, Grad I, Schrenzel J, Lange N, et al. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis and photodynamic Therapy*. 2013;10(2):134-40.
127. Pinheiro ALB, Aciole GTS, Cangussú MCT, et al. Effects of *laser* phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration: A Raman spectroscopic study. *Journal Biomedical Material Research. Part A*. 2010;95:1041-7.

128. Pinheiro ALB, Brugnera Jr, Zanin FAA. Aplicação do *Laser* na Odontologia. São Paulo: Santos. 2010;428.
129. Pinheiro ALB, Gerbi MEMM. Photobioengineering of the bone repair process. *Photomedicine and laser Surgery*. 2006;24:169-78.
130. Pinheiro ALB, Gerbi MEMM, Limeira Jr FA, et al. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red *laser* photobiomodulation: a histological study in a rodent mode. *Lasers Med Sci*. 2009;24: 234-40.
131. Pinheiro ALB, Gerbi MEMM, Ponzi EAC, et al. Infrared *laser* Light Further Improves Bone Healing When Associated with Bone Morphogenetic Proteins and Guided Bone Regeneration: An in Vivo Study in a Rodent Model. *Photomedicine and laser Surgery*. 2008;26:167-74.
132. Pinheiro ALB, Limeira Jr FA, Gerbi MEMM, et al. Effect of 830nm *laser* light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *Journal of Clinical laser Medicine and Surgery*. 2003;21:383-88.
133. Pinheiro ALB, Limeira Jr FA, Gerbi MEMM, et al. Effect of low level *laser* therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Brazilian Dental Journal*. 2003;14:177-81.
134. Pinheiro ALB, Limeira Jr FA, Gerbi MEMM, et al. Effect of 830nm *laser* Light on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone and Decalcified Cortical Osseous Membrane, *Journal of Clinical laser Medicine and Surgery*. 2003;21:383-8.
135. Pinheiro ALB, Lopes CB, Pacheco MTT, et al. Raman Spectroscopy Validation of DIAGNOdent-Assisted Fluorescence Readings on Tibial Fractures Treated with *laser* Phototherapy, BMPs, Guided Bone Regeneration, and Miniplates. *Photomedicine and laser Surgery*. 2010;28:S89-97.
136. Pinheiro ALB, Oliveira MAM, Martins PPM. Biomodulação da cicatrização óssea pós-implantar com o uso da laserterapia não-cirúrgica: Estudo por microscopia eletrônica de varredura. *Revista da FOUFBA*. 2001;22:12-9.
137. Pinheiro ALB, Santos NRS, Oliveira PC. The efficacy of the use of IR *laser* phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with wire osteosynthesis: a comparative *laser* fluorescence and Raman spectral study on rabbits. *Lasers Med Sci*. 2013;28:815-22.
138. Pinheiro ALB, Soares LGP, Aciole GTS, et al. Light microscopic description of the effects of *laser* phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. *J Journal Biomedical Material Research. Part A*. 2011;98:212-21.
139. Pinheiro ALB, Soares LGP, Barbosa AFS, Ramalho LMP, Santos JN. Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. *Lasers Med Sci*. 2012;27:1013-24.

140. Pinheiro ALB, Soares LGP, Cangussú MCT, et al. Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. *Lasers Med Sci.* 2012;27:903-16.
141. Pinheiro ALB, Ramalho LMP. Effect of IR *laser* photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers Med Sci.* 2008;23(3):313-7.
142. Powell K, Low P, McDonnell P, Laakso E, Ralph S. The effect of *laser* irradiation on proliferation of human breast carcinoma, melanoma, and immortalized mammary epithelial cells. *Photomedicine and laser Surgery.* 2010;28(1):115-23.
143. Prates R, Kato I, Ribeiro M, Tegos G, Hamblin M. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011;66(7):1525-1532.
144. Prates R, Silva E, Suzuki L, Paula C, Ribeiro M. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. *Revista Brasileira de Física Médica.* 2010;4(1):53-7.
145. Queiroga AS. Avaliação a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre a inativação de espécies do gênero *Candida*: estudo *in vitro* [Tese de Doutorado]. Programa Integrado de Doutorado em Odontologia UFPB/UFBA. João Pessoa: UFPB/UFBA; 2010.
146. Reis FA, Belchior ACG, Nicolau RA, Fonseca TS, Carvalho PTC. Efeito da terapia com *laser* de arsenieto de gálio e alumínio (660Nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotome se seguida de anastomose epineural: análise funcional. *Brazilian Journal of Physical Therapy.* 2008;12(3):215-21.
147. Riso NDM, Ferrari TA, Ciarlini LDRP, Louzada MJQ. *laser* Terapêutico no Reparo Ósseo de Ratos Submetidos a Ausência de Carga. *Veterinária e Zootecnia.* 2010;17(2):250-8.
148. Ritter C, Kuhl I, Lenhardt C, Weissbluth M, Bakos R. Terapêutica fotodinâmica com ácido delta-aminolevulínico e luz de diodos em ceratoses actínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2010;85(5):639-45.
149. Robertson C, Evans D, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2009;96(1):1-8.
150. Ronnest N, Stocks S, Lantz A, Gernaey K. Comparison of *laser* diffraction and image analysis for measurement of *Streptomyces coelicolor* cell clumps and pellets. *Biotechnology Letters.* 2012;34(8):1465-73.
151. Rosa CB, Castro Vieira IC, Reis Júnior JA et al. The efficacy of the use of IR *laser* phototherapy (LPT) on bone defect grafted with biphasic ceramic on rats with iron deficiency anemia: Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci.* 2014;29(3):1251-9.

152. Rosa CB, Habib FAL, Araújo TM. Effect of the *laser* and light-emitting diode (LED) phototherapy on midpalatal suture bone formation after rapid maxilla expansion: a Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci*. 2014;29(3):859-67.
153. Salate A, Barbosa G, Gaspar P, Koeke P, Parizotto N, Benze B, et al. Effect of In-Ga-Al-P diode *laser* irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomedicine and Laser Therapy*. 2005;23(5):470-5.
154. Samkoe K, Chen A, Rizvi I, O'Hara J, Hoopes P, Pereira S, et al. Imaging tumor variation in response to photodynamic therapy in pancreatic cancer xenograft models. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2010;76(1):251-9.
155. Sampaio S, Monteiro J, Cangussú M, Santos G, dos Santos M, dos Santos J, et al. Effect of *laser* and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):799-806.
156. Santos AJD. Efeitos da terapia com *laser* baixa potência em melanoma: ensaios *in vitro*. [Dissertação de Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais]. São Paulo: Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares; 2013.
157. Santos PM. Marcação radioativa e Biodistribuição de um Fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica. [Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas]. Covilhã: Universidade da Beira Interior; 2012.
158. Santos T, Piva M, Ribeiro M, Antunes A, Melo A, Silva E. *Laser*therapy efficacy in temporomandibular disorders: control study. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2010;76(3):294-9.
159. Selman S. Photodynamic therapy for prostate cancer: One urologist's perspective. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2007;4(1):26-30.
160. Silva E, dos Santos E, Ricci-Júnior E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. *Revista Brasileira de Farmácia*. 2009;90(3):211-7.
161. Silva RC. Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2007.
162. Simplicio F, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*. 2002;25(5):801-7.
163. Siqueira, IAWB. Ação do *laser* de baixa potência na produção de metabólitos secundários do dermatófito *Trichophyton rubrum*. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Univap; 2011. 48p.
164. Soares LGP, Magalhães Junior EB, Magalhães CA, Ferreira CF, Marques AMC, Pinheiro ALB. New Bone Formation around Implants Inserted on Autologous and

Xenografts Irradiated or not with IR *laser* Light: A Histomorphometric Study in Rabbits. Brazilian Dental Journal. 2013;24:218-23.

165. Soares LGP, Marques AMC, Aciole JMS, et al. Assessment *laser* phototherapy on bone defects grafted or not with biphasic synthetic micro-granular HA + β -tricalcium phosphate: histological study in an animal model. Proc. SPIE 8932, Mechanisms for Low-Light Therapy. 2014;IX:893211.

166. Soares LGP, Marques AMC, Aciole JMS, et al. Do *laser*/LED phototherapies influence the outcome of the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic microgranular HA + β -tricalcium phosphate? A Raman spectroscopy study. Lasers Med Sci. 2014;29(5):1575-84.

167. Soares LGP, Marques AMC, Guarda MG, Aciole JMS, Santos JN, Pinheiro ALB. Influence of the 780 nm *laser* Light on the Repair of Surgical Bone Defects Grafted or not with Biphasic Synthetic Micro-Granular Hydroxylapatite + Beta - Calcium Triphosphate. Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology. 2014;131:16-23.

168. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. Lasers Surg Med. 1996;18(3):253-9.

169. Souza C, Felício L, Ferreira J, Kurachi C, Bentley M, Tedesco A, et al. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode *laser* single session for non-melanoma skin cancer. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2009;6(3):207-13.

170. Szeimies R, Matheson R, Davis S, Bhatia A, Frambach Y, Kloevekorn W, et al. Topical Methyl Aminolevulinate Photodynamic Therapy Using Red Light-Emitting Diode Light for Multiple Actinic Keratoses: A Randomized Study. Dermatologic Surgery. 2009;35(4):586-92.

171. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, et al. Photodynamic Therapy Can Induce a Protective Innate Immune Response against Murine Bacterial Arthritis via Neutrophil Accumulation. PLoS One. 2012;7(6):e39823.

172. Tardivo JP, Baptista MS. Treatment of osteomyelitis in the feet of diabetic patients by photodynamic antimicrobial chemotherapy. Photomed Laser Surg. 2009;27(1):145-50.

173. Tardivo J, Wainwright M, Baptista M. Local clinical phototreatment of herpes infection in São Paulo. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2012;9(2):118-21.

174. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. Medicina (Ribeirão Preto). 2008; 41(3):259-64.

175. Topaloglu N, Gulsoy M, Yuksel S. Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode *laser*. Photomedicine and laser surgery. 2013;31(4):155-62.

176. Torezan L, Niwa A. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações; Photodynamic therapy in dermatology: basic principles. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2009;84(5):445-59.
177. Torres CS, Santos JN, Pinheiro ALB, et al. Does the Use of *laser* Photobiomodulation, bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration Improve the Outcome of Autologous Bone Grafts? An in Vivo Study in a Rodent Model. Photomedicine and *laser* Surgery. 2008;26:371-7.
178. Trachtenberg J, Bogaards A, Weersink R, et al. Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response. The Journal of Urology. 2007;178(5):1974-9.
179. Triesscheijn M, Baas P, Schellens J, Stewart F. Photodynamic therapy in oncology. The Oncologist. 2006;11(9):1034-44.
180. Trushina O, Novikova E, Sokolov V, Filonenko E, Chissov V, Vorozhtsov G. Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2008;5(4):256-9.
181. Tserkovsky DA, Alexandrova EN, Chalau VN, Istomin YP. Effects of combined sonodynamic and photodynamic therapies with photolon on a glioma C6 tumor model. Exp Oncol. 2012;34(4):332-5
182. Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Hayashi H, Ohtani K, Maehara S, et al. Outcome of photodynamic therapy using NPe6 for bronchogenic carcinomas in central airways > 1.0 cm in diameter. Clinical Cancer Research. 2010;16(7):2198-204.
183. Volpato LER. Avaliação do uso do *laser* de baixa intensidade e do Light Emitting Diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico [Tese de Doutorado em Odontologia]. Bauru: Universidade de São Paulo; 2009.
184. Wainwright M. Methylene blue derivatives – suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? International Journal of Antimicrobial Agents. 2000;16(4):381-94.
185. Wainwright M. Photoantimicrobials – So what's stopping us? Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2009; 6(3):167-9.
186. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998;42(1):13-28.
187. Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2005;2(4):263-72.
188. Weber JBB, Pinheiro ALB, de Oliveira MG, et al. *laser* Therapy Improves Healing of Bone Defects submitted to Autologous Bone graft. Photomedicine and *laser* Surgery. 2006;24:38-44.

189. WHO/TDR. For Research on Diseases of Poverty [Internet]. [Cited 2013 Jul 17]. Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/african-trypanosomiasis/en/index.html>.
190. Xu J, Xiang L, Chen J, He Q, Li Q, Li J, et al. The combination treatment using CO₂ *laser* and photodynamic therapy for HIV seropositive men with intraanal warts. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(2):186-193.
191. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch. Oral Biol*. 1992; 37:883–887.
192. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J. Dent*. 1994;22:273–278.

24

CAPÍTULO

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS PARA A DETECÇÃO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS, ALIMENTOS E RAÇÕES

Elisabete Yurie Sataque Ono
Jaqueline Gozzi Bordini
Aline Myuki Omori
Melissa Tiemi Hirozawa
Mario Augusto Ono

24.1 INTRODUÇÃO

Os produtos agrícolas, devido à sua alta qualidade nutricional, constituem um substrato suscetível à contaminação por fungos toxigênicos¹. Essa contaminação, além de reduzir a produtividade e a qualidade dos grãos, acarretando perdas econômicas, podem causar efeitos tóxicos em seres humanos e animais devido à produção de metabólitos secundários tóxicos,

denominados micotoxinas². A contaminação por micotoxinas pode ocorrer no campo, durante a colheita, no transporte e no armazenamento dos grãos e depende de fatores biológicos e ambientais³.

Os fungos toxigênicos envolvidos na contaminação da cadeia produtiva de grãos pertencem principalmente aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*^{3,4}. As micotoxinas de maior impacto econômico a contaminar produtos agrícolas em regiões de climas tropical e subtropical são as fumonisinas e as aflatoxinas, produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*⁵, e por *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare, respectivamente^{6,7}.

A ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos agrícolas é um problema reportado no mundo todo⁸⁻¹¹. Devido à alta frequência e aos riscos à saúde associados às aflatoxinas e fumonisinas, diversos países estabeleceram ou reduziram os limites regulatórios para micotoxinas. Em 2003, ao menos 99 países possuíam alguma legislação para micotoxinas, o que representou um aumento de 30% em relação a 1995¹². As legislações estão cada vez mais rigorosas, e os países exportadores de produtos agrícolas estão se adequando às novas exigências internacionais sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas, visando à manutenção de seus produtos no mercado. No Brasil, o limite máximo para aflatoxinas era de 50 µg/Kg em milho e em outras matérias-primas¹³. Contudo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução RDC nº 07/2011, reduziu os limites máximos tolerados de aflatoxinas em milho e amendoim para 20 µg/Kg, além de estabelecer limites máximos para as fumonisinas em milho (5.000 µg/Kg) e para outras micotoxinas para as quais antes não existiam parâmetros no Brasil¹⁴.

Tendo em vista que a contaminação de produtos agrícolas por fungos toxigênicos e micotoxinas é difícil de evitar, um monitoramento contínuo de grãos, alimentos e rações por meio de métodos sensíveis e precisos é essencial para minimizar os efeitos tóxicos e as perdas econômicas.

Os métodos convencionais de identificação e detecção de fungos incluem o cultivo em diversos meios, exame microscópico e análises químicas de quitina, ergosterol ou metabólitos secundários. Com exceção do último, que inclui micotoxinas, os demais métodos apresentam baixa especificidade e reprodutibilidade e consomem muito tempo¹⁵. Os estudos de sistemática molecular, apesar de possuírem alta especificidade, também apresentam custo elevado¹⁶.

As micotoxinas são geralmente detectadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês, *high performance liquid*

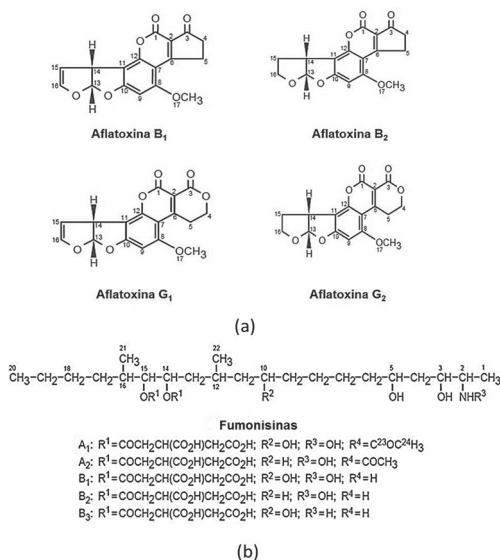


Figura 24.1 (a) Estrutura das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂; (b) estrutura das fumonisinas A₁, A₂, B₁, B₂ e B₃. Fonte: CAST (2003)³, com permissão para a reprodução.

chromatography – HPLC), cromatografia gasosa e espectrometria de massa^{17,18}. A cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS/MS) tem sido utilizada para a determinação simultânea de várias micotoxinas com baixos limites de detecção. Contudo, a necessidade de uma extensa pré-limpeza da amostra, o que aumenta os custos, a utilização de solventes e as limitações da análise *in situ* tornam necessária a utilização de técnicas alternativas^{17,19}.

Os métodos imunológicos para a detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas constituem técnicas alternativas promissoras. Esses métodos apresentam várias vantagens, como facilidade de operação, especificidade e alta sensibilidade, além de não requererem etapa de pré-limpeza da amostra, permitirem a análise simultânea de várias amostras, não utilizarem reagentes tóxicos e poderem ser realizados no campo^{15,20-23}.

Neste capítulo, são abordados conceitos básicos relativos a anticorpos e antígenos, tipos de imunoensaios, imunoensaios para a detecção de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., assim como para a detecção de aflatoxinas e fumonisinas.

24.2 CONCEITOS BÁSICOS RELATIVOS A ANTICORPOS E ANTÍGENOS

Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B em resposta principalmente a patógenos como vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos. Os linfócitos B podem produzir anticorpos contra praticamente qualquer antígeno. Há cinco classes de anticorpos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Nos ensaios imunológicos, geralmente são utilizados anticorpos IgG. Os sítios de ligação, localizados na extremidade N-terminal dos anticorpos, ligam-se a regiões dos antígenos denominadas epítomos. Os antígenos que induzem uma resposta imune são denominados imunógenos. Antígenos de baixa massa molecular que para induzir uma resposta imune precisam ser conjugados com moléculas carreadoras (proteínas como albumina bovina e ovalbumina) são denominados haptenos (Figura 24.2).

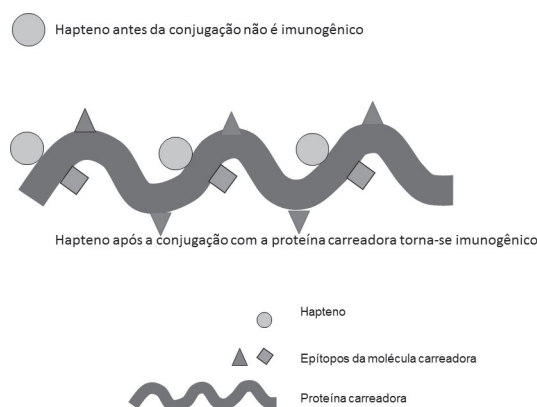


Figura 24.2 Sistema hapteno-molécula carreadora. A molécula de hapteno, devido à baixa massa molecular, não apresenta imunogenicidade. Porém, quando conjugada à molécula carreadora, torna-se imunogênica.

Devido à propriedade de interagir com antígenos com alta especificidade, os anticorpos podem ser utilizados como ferramentas para a detecção qualitativa ou quantitativa de diferentes moléculas. Os anticorpos podem ser produzidos em animais como coelhos, ratos e camundongos por meio da inoculação do animal com várias doses do antígeno e posterior purificação dos anticorpos do soro hiperimune. Embora a produção desses anticorpos, denominados policlonais, seja relativamente simples e de baixo custo, devido ao fato de ser resultante da ativação de vários clones de linfócitos B

pode ocorrer reatividade cruzada com antígenos diferentes dos utilizados na imunização.

Os anticorpos monoclonais, por sua vez, são produzidos por meio da fusão de células B tumorais com células B de camundongos isogênicos e, embora sejam tecnicamente mais difíceis de serem produzidos, constituem reagentes homogêneos, de maneira que um determinado anticorpo monoclonal possui apenas um tipo de sítio de ligação ao antígeno e, consequentemente, liga-se a um único epítopo.

24.3 TIPOS DE IMUNOENSAIOS

Os ensaios imunoenzimáticos ELISA, do acrônimo *enzyme linked immunosorbent assay*, têm sido amplamente utilizados para a detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas e baseiam-se na conjugação do antígeno ou do anticorpo com uma enzima. Nos ensaios em que se utilizam dois anticorpos, o anticorpo não marcado que se liga ao antígeno é denominado anticorpo primário, enquanto o anticorpo marcado com enzima que se liga ao anticorpo primário é denominado anticorpo secundário. Os principais tipos de ELISAs são o indireto, o competitivo direto (dc-ELISA), o competitivo indireto (ic-ELISA) e o ELISA sanduíche.

O ELISA indireto é uma técnica qualitativa e consiste na detecção da interação de um anticorpo primário não marcado com o antígeno imobilizado na microplaca. A ligação do anticorpo primário ao antígeno é detectada por meio de um anticorpo secundário marcado com uma enzima (Figura 24.3). Esse método é mais utilizado na detecção de anticorpos em amostra de soro para diagnóstico de doenças infecciosas.

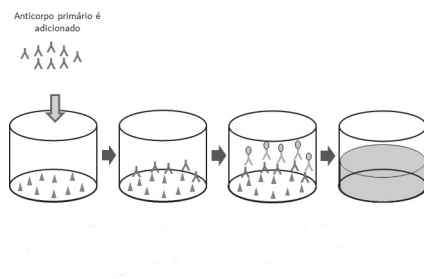


Figura 24.3 ELISA indireto. O anticorpo é adicionado à placa contendo antígeno imobilizado. Ao adicionar o anticorpo secundário marcado com enzima e posteriormente o substrato, a coloração desenvolvida será proporcional à ligação do anticorpo primário ao antígeno.

No ELISA competitivo direto (dc-ELISA), a sensibilização da microplaca é realizada com o anticorpo específico, ocorrendo a competição entre o antígeno presente na amostra e o antígeno marcado com uma enzima pelo sítio de ligação do anticorpo. Assim, quanto maior a concentração de antígeno na amostra, menor será a ligação do antígeno marcado com o anticorpo²⁴ (Figura 24.4).

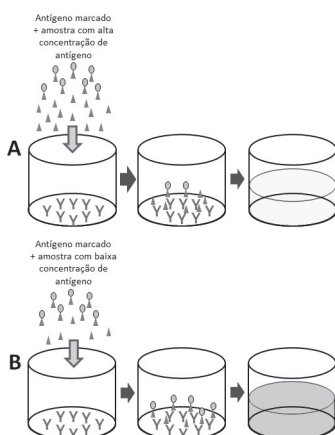


Figura 24.4 ELISA competitivo direto (dc-ELISA). Antígeno marcado com enzima é adicionado juntamente com as amostras contendo: (A) alta concentração de antígeno; ou (B) baixa concentração do antígeno a ser analisado. Quanto maior a concentração do antígeno na amostra, menor será a ligação do antígeno marcado aos anticorpos e, consequentemente, menor será a coloração da reação após a adição do substrato.

No ELISA competitivo indireto (ic-ELISA), a competição ocorre entre o antígeno imobilizado na microplaca e o antígeno presente na amostra, pelo sítio de ligação do anticorpo. A amostra contendo o antígeno é misturada ao anticorpo e então adicionada à microplaca. A ligação entre o anticorpo e o antígeno da placa será tanto menor quanto maior for a concentração de antígeno na amostra. Para detectar o anticorpo primário, utiliza-se um anticorpo secundário marcado com enzima. Quanto maior a concentração de antígeno na amostra, menor será a absorvância²⁴ (Figura 24.5).

O ELISA sanduíche apresenta duas etapas. Na primeira etapa a amostra contendo o antígeno é adicionada à microplaca e ocorre a ligação com o anticorpo imobilizado. Na segunda etapa, é adicionado um segundo anticorpo marcado com enzima que se liga a um epítopo diferente no antígeno.

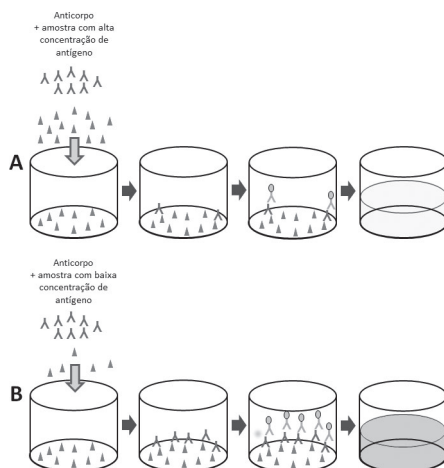


Figura 24.5 ELISA competitivo indireto (ic-ELISA). O anticorpo é adicionado juntamente com as amostras contendo: (A) alta concentração de antígeno; ou (B) baixa concentração do antígeno a ser analisado. Quanto maior a concentração do antígeno na amostra, menor será a ligação do anticorpo primário ao antígeno imobilizado na placa. Ao adicionar o anticorpo secundário marcado com enzima e posteriormente o substrato, a coloração desenvolvida será inversamente proporcional à concentração de antígeno na amostra.

Assim, após a adição do substrato, a absorvância será diretamente proporcional à concentração de antígeno presente na amostra²⁴ (Figura 24.6).

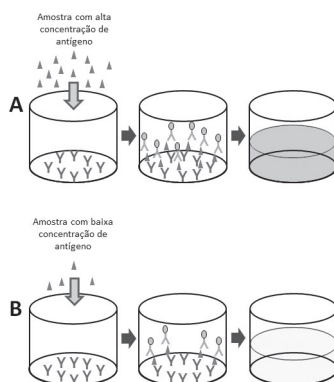


Figura 24.6 ELISA sanduíche. Amostras contendo: (A) alta concentração de antígeno; ou (B) baixa concentração do antígeno a ser analisado, são adicionadas à placa. Quanto maior a concentração do antígeno na amostra, maior será a ligação ao anticorpo de captura imobilizado na placa. Ao adicionar o anticorpo secundário marcado com enzima e posteriormente o substrato, a coloração desenvolvida será diretamente proporcional à concentração de antígeno na amostra.

O desenvolvimento de um ELISA requer a determinação do limite de detecção ou sensibilidade e da especificidade do anticorpo para garantir resultados mais consistentes²⁵.

A imunocromatografia, também chamada de teste de fluxo-lateral, baseia-se em uma membrana (geralmente de nitrocelulose) dividida em várias camadas, incluindo uma camada da amostra, uma camada do conjugado (anticorpo antimicotoxina conjugado com ouro), uma camada absorvente, além de uma zona teste e uma zona controle, que contêm a micotoxina conjugada a uma proteína e a um anticorpo secundário (antianticorpo), respectivamente. O extrato de uma amostra é adicionado à camada da amostra, fluindo para a camada do conjugado por capilaridade, continuando a migrar juntos ao longo da membrana, atingindo a zona teste e controle. Em uma amostra positiva, o anticorpo antimicotoxina conjugado com ouro coloidal irá se ligar à micotoxina presente na amostra e não estará livre para se ligar à micotoxina-proteína imobilizada na membrana. Portanto, não formará uma linha visível na zona teste. Por outro lado, em uma amostra negativa, o conjugado anti-micotoxina-ouro estará disponível para se ligar à micotoxina-proteína imobilizada e formará uma linha visível na zona teste. A zona controle será sempre visível, independentemente da presença ou ausência de micotoxinas, uma vez que o segundo anticorpo sempre irá capturar o conjugado antimicotoxina-ouro, indicando a validade do teste (Figura 24.7)^{23,26}.

A imunocromatografia é um método rápido que fornece resultados em 5 a 15 minutos e é utilizada para a detecção qualitativa de micotoxinas principalmente na triagem de amostras. Recentemente, porém, foram descritos métodos imunocromatográficos semiquantitativos e quantitativos para a análise de micotoxinas em cereais^{27,28}.

Os *dipsticks* são constituídos de uma tira de membrana de nitrocelulose com anticorpo específico antimicotoxina imobilizado. A tira é imersa

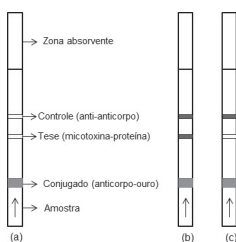


Figura 24.7 (A) Esquema de uma imunocromatografia para a detecção de micotoxinas; (B) detecção visual de uma amostra negativa e (C) positiva.

inicialmente na solução contendo a amostra e o conjugado micotoxina-enzima para ocorrer a competição e em seguida na solução de substrato cromogênico. Quando a micotoxina está presente na amostra não ocorre o desenvolvimento de cor na área sensibilizada com o anticorpo antimicotoxina. Há também um controle que consiste numa área da tira sensibilizada com um anticorpo antienzima, que captura o conjugado micotoxina-enzima, promovendo o desenvolvimento de cor²⁹. Alguns *dispsticks*, em vez de utilizarem conjugados enzimáticos e substratos cromogênicos, utilizam conjugados de anticorpos marcados com ouro coloidal³⁰.

Os *dipsticks* são utilizados para detectar visualmente a presença de micotoxinas, fornecendo uma avaliação qualitativa (negativa/positiva) das amostras em aproximadamente 30 minutos. Contudo, estão disponíveis alguns leitores fotométricos portáteis para analisar eletronicamente os *dispticks*, fornecendo resultados semiquantitativos³¹⁻³⁴.

24.4 IMUNOENSAIOS PARA A DETECÇÃO DE *Aspergillus* spp. E *Fusarium* spp.

24.4.1 *Aspergillus* spp.

As espécies de *Aspergillus* são muito importantes economicamente, tanto pelos efeitos benéficos, devido à ampla utilização na síntese de produtos químicos, nas transformações biossintéticas e na produção de enzimas, quanto pelos efeitos prejudiciais, devido à deterioração de alimentos e produção de micotoxinas¹⁵. Esses fungos estão distribuídos em todo o mundo, uma vez que crescem em uma ampla faixa de temperatura (de 14 °C a 43 °C), sendo mais frequentes em regiões de clima subtropical e temperado^{2,35,36}.

A produção de aflatoxinas foi reportada em três diferentes grupos de *Aspergilli*: *Aspergillus* seção Flavi, *Aspergillus* seção Nidulantes e *Aspergillus* seção Ochraceorosei³⁷. No Brasil, foram relatadas apenas três espécies produtoras de aflatoxinas pertencentes à seção Flavi (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*). A espécie *A. flavus* encontra-se amplamente distribuída e é a principal produtora de aflatoxina tipo B, enquanto as outras duas espécies são mais frequentemente reportadas como produtoras de aflatoxinas tipo B e G em amostras naturalmente contaminadas³⁸.

A imunofluorescência, o ELISA e o imunossensor são técnicas imunológicas utilizadas para detectar espécies toxigênicas de *Aspergillus* em alimentos

visando avaliar o nível de contaminação. O ELISA é o principal método imunológico utilizado, e o imunossensor, que começou a ser desenvolvido mais recentemente, é um método promissor.

A imunofluorescência utilizando anticorpos de coelho contra antígeno micelial de *A. flavus* foi um dos primeiros métodos imunológicos desenvolvidos para detectar esse fungo em grãos³⁹. Os grãos eram incubados com soro de coelho antiantígeno micelial de *A. flavus*, lavados e incubados com anticorpo anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína e examinados por microscopia de fluorescência. Os anticorpos antiantígeno micelial de *A. flavus* apresentaram forte fluorescência quando incubados com micélio de *A. flavus* e *A. candidus*, fluorescência moderada com micélio de *A. fumigatus* e fluorescência tênue com micélios de espécies de outros gêneros fúngicos. Embora esse método possibilite a detecção de *A. flavus* em grãos, apresenta como restrição a necessidade de análise individual dos grãos, de modo que não é viável sua utilização na avaliação de contaminação de grandes quantidades de amostras.

O ensaio imunoenzimático utilizando microplacas permite a análise de diversas amostras simultaneamente e possibilita o monitoramento de grande número de amostras. Um ELISA sanduíche baseado em anticorpo de coelho para antígenos miceliais de *A. parasiticus* foi utilizado para detectar fungos aflatoxigênicos em cereais (milho, amendoim, arroz e trigo) natural e artificialmente contaminados. Essa técnica apresentou um limite de detecção para *A. parasiticus* de 1 µg/mL e uma forte correlação positiva com o método tradicional de contagem em placa a um nível de atividade de água (a_w) de 0,98, com coeficientes de correlação de 0,94, 0,93, 0,96 e 0,86 para milho, arroz, trigo e amendoim, respectivamente. Em níveis de a_w mais baixos, essa correlação diminuiu, provavelmente devido ao fato de o ELISA quantificar o antígeno micelial e a contagem em placa detectar colônias provenientes tanto de esporos quanto de micélios, sendo a formação de esporos favorecida por a_w baixos. Em amostras naturalmente contaminadas, foi necessária a hidratação ($a_w = 0,92$) e a incubação a 28 °C por 29 dias para que o ensaio imunoenzimático detectasse fungos aflatoxigênicos em 52% das amostras analisadas⁴⁰.

Yong e Cousin⁴¹ utilizaram um ELISA sanduíche^{42,43} para detectar *A. parasiticus* em amostras de milho naturalmente contaminadas por aflatoxinas e em amostras de amendoim e milho artificialmente contaminadas por esse fungo. Os anticorpos policlonais de coelho para antígenos extracelulares de *A. parasiticus* utilizados nesse teste apresentaram reatividade cruzada apenas com antígenos extracelulares e miceliais de três espécies (*A. flavus*,

A. oryzae e *A. sojae*) das 37 analisadas. Todas as amostras de milho naturalmente contaminadas por aflatoxinas foram positivas no ELISA sanduíche e estavam contaminadas com fungos aflatoxigênicos, e duas amostras com contagem de fungos (10^3 CFU/g) foram positivas no ELISA apesar da ausência de aflatoxinas. A análise diária de milho e de amendoim contaminados artificialmente com *A. parasiticus* quanto aos níveis de antígeno e aflatoxinas demonstrou a capacidade do ELISA sanduíche de detectar antígeno antes que níveis detectáveis de aflatoxinas por cromatografia em camada delgada fossem produzidos, sugerindo que esse método apresenta potencial para detecção precoce de fungos produtores de aflatoxinas.

Anticorpos produzidos contra duas proteínas quiméricas recombinantes produzidas em *Escherichia coli*, resultantes dos genes *ver-1* e *apa-2* de *A. parasiticus*, que estão envolvidos na biossíntese de aflatoxinas, apresentaram potencial para serem utilizados em métodos imunológicos para detecção de fungos aflatoxigênicos. Esses anticorpos reagiram mais fortemente com antígeno de *A. parasiticus* e *A. flavus* em relação a antígenos de outros fungos quando analisados por ELISA, enquanto os anticorpos produzidos contra o filtrado do cultivo de *A. parasiticus* reagiram com todas as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, indicando a maior especificidade dos anticorpos produzidos contra as proteínas quiméricas envolvidas na biossíntese de aflatoxinas⁴⁴.

Villamizar, Maroto e Rius⁴⁵ desenvolveram um biossensor eletroquímico para detecção de *A. flavus* de forma mais rápida que o ELISA. O dispositivo é constituído por um transistor de efeito de campo de nanotubos de carbono ligado a anticorpo de coelho anti-*A. flavus*. A ligação do antígeno fúngico ao anticorpo causa alterações na corrente elétrica que podem ser medidas em função da voltagem⁴⁶. O biossensor desenvolvido nesse trabalho apresentou um limite de detecção de 10 µg/g para amostras de arroz artificialmente contaminadas por *A. flavus* e apresentou reatividade cruzada com *P. chrysogenum* a 100 ng/mL. A aplicação do biossensor para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas em amostras de arroz é promissora, uma vez que não apresentou reatividade com *P. chrysogenum* em concentrações abaixo de 100 ng/mL e o resultado é obtido em apenas 30 minutos.

Outro biossensor para detecção de espécies de *Aspergillus* aflatoxigênicas baseado na imobilização de anticorpos de coelho antiantígeno extracelular de *A. parasiticus* sobre eletrodo de ouro modificado foi desenvolvido por Sun et al.⁴⁷. O biossensor apresentou alta reatividade com antígenos de *A. parasiticus* e *A. flavus* (88,0% a 98,2%) e baixa reatividade com

outras espécies de *Aspergillus* e outros gêneros fúngicos (4% a 16%). A taxa de recuperação média de *A. parasiticus* inoculado em suspensão de soja variou de 81,5% a 113,5%. O método também permitiu a detecção de *A. parasiticus* durante o processo de produção e fermentação da pasta de soja. As contagens de *Aspergillus* aflatoxigênicos foram maiores durante o processo de produção e diminuíram gradualmente durante o período de fermentação. Por outro lado, os níveis de AFB₁ foram maiores com dois meses de fermentação e diminuíram gradualmente, sugerindo que esse imunossensor possibilita a detecção precoce de aflatoxinas durante o processamento de alimentos.

24.4.2 *Fusarium* spp.

As espécies de *Fusarium* são importantes fitopatógenos, causando uma ampla variedade de doenças tais como apodrecimento de raiz e caule, que causam prejuízos econômicos a agricultores por afetar a produtividade e a qualidade de produtos agrícolas. Além disso, produzem diversas micotoxinas, como fumonisinas, zearalenona, tricotecenos, desoxinivalenol e toxina T-2, que afetam a saúde de seres humanos e animais¹⁵.

As fumonisinas são produzidas principalmente por *F. verticillioides* Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) e *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg⁴⁸ e estão associadas a diversas doenças em animais e seres humanos^{5,49-51}.

O ELISA é o principal método imunológico desenvolvido para detectar espécies de *Fusarium* e é utilizado no monitoramento da eficiência de fungicidas, na determinação da resistência de linhagens de plantas e no controle de qualidade de grãos⁵²⁻⁵⁸.

A detecção é baseada na interação de anticorpos específicos com antígenos do fungo, como componentes miceliais e exoantígenos⁵⁹⁻⁶¹. Exoantígenos são macromoléculas imunogênicas produzidas e secretadas por fungos no meio de cultura que podem ser utilizados na detecção e identificação de fungos por serem espécie ou gênero-específicos para muitas espécies fúngicas⁶⁰.

O ELISA pode detectar a presença de fungos em alimentos processados por tratamento térmico, filtração e irradiação gama, e pode detectar quantitativamente a biomassa fúngica⁶².

Gan et al.⁵⁹ caracterizaram anticorpos produzidos em galinhas contra antígenos miceliais solúveis e exoantígenos de três espécies toxigênicas de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. poae* e *F. sporotrichioides*). Os anticorpos

produzidos contra os antígenos miceliais solúveis apresentaram reatividade cruzada com antígenos de outros gêneros fúngicos, enquanto os anticorpos produzidos contra os exoantígenos de *F. graminearum* e *F. sporotrichioides* apresentaram especificidade quanto ao gênero, enquanto que os anticorpos produzidos contra os exoantígenos de *F. poae* apresentaram especificidade quanto à espécie. Os anticorpos não apresentaram reatividade cruzada com extrato de grãos, sugerindo sua aplicabilidade na detecção de *Fusarium* spp. em cereais.

Baseando-se no trabalho de Gan et al.⁵⁹, Abramson et al.⁶³ desenvolveram um ic-ELISA utilizando anticorpos produzidos em galinhas contra exoantígeno de *F. sporotrichioides* para detectar exoantígeno de *Fusarium* spp. em amostras de trigo natural e artificialmente contaminadas. Esse anticorpo foi selecionado por ser gênero-específico e pela capacidade de reagir com exoantígenos de outras espécies de *Fusarium*, incluindo as cinco espécies toxigênicas mais importantes (*F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* e *F. verticillioides*)^{59,64,65}. O ELISA desenvolvido nesse estudo apresentou potencial para ser utilizado na detecção de exoantígenos de *Fusarium* spp. em amostras de trigo, apresentando um limite de detecção de 0,03 µg/mL. As concentrações de exoantígenos de *Fusarium* spp. determinadas por esse método variaram de 1,76 µg/g a 52,80 µg/g com valor médio de 13,00 µg/g em amostras de trigo artificialmente contaminadas e de 1,23 µg/g a 15,52 µg/g com valor médio de 4,16 µg/g em amostras de trigo naturalmente contaminadas. Essas concentrações de exoantígenos apresentaram uma forte correlação positiva com os níveis de desoxinivalenol (DON) determinados por espectrometria de massa e ELISA, com coeficientes de correlação de 0,8 para amostras de trigo artificialmente contaminadas e de 0,76 para amostras de trigo naturalmente contaminadas.

Outro ic-ELISA gênero-específico para detecção de *Fusarium* spp. em alimentos e grãos foi desenvolvido por Iyer e Cousin⁶⁶, utilizando anticorpos de coelho contra proteínas extraídas do micélio de *F. graminearum* e *F. verticillioides*, apresentando um limite de detecção para *F. graminearum* e *F. verticillioides* de 0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL, respectivamente.

Meirelles et al.⁵⁴ desenvolveram um ic-ELISA utilizando anticorpos de coelho contra exoantígenos de *F. verticillioides* com o objetivo de quantificar exoantígenos de *F. verticillioides* em amostras de milho recém-colhido. O limite de detecção desse ensaio foi de 1,6 µg/g, e as concentrações de exoantígenos determinadas por esse método variaram de 8,9 µg/g a 965,0 µg/g, com valor médio de 217,3 µg/g. Essas concentrações apresentaram alta correlação positiva (0,84) com a biomassa de *F. verticillioides* cultivado em

caldo de infusão de cérebro e coração, correlação positiva média com os níveis de ergosterol (0,52) e não apresentaram correlação com os níveis de fumonisinas (0,05). A falta de correlação entre as concentrações de exoantígenos e de fumonisinas pode dever-se à falta de especificidade do método ao exoantígeno de *F. verticillioides*, uma espécie produtora de fumonisinas, uma vez que os anticorpos policlonais de coelho contra exoantígenos de *F. verticillioides* apresentaram alta reatividade cruzada com exoantígenos de *F. graminearum* (51%), *F. subglutinans* (76%) e *F. sporotrichioides* (65%)⁶⁷. Portanto, esse método foi gênero-específico e permitiu a detecção e quantificação de exoantígenos de *Fusarium* spp. em amostras de milho.

A utilização de anticorpo monoclonal específico para *Fusarium* spp. no desenvolvimento de ELISA indireto para detectar espécies de *Fusarium* causadoras de giberela em grãos de cevada infectados artificial ou naturalmente foi relatado por Hill et al.⁵³. Esse ELISA indireto permitiu a quantificação de antígenos extraídos dos grãos e apresentou um coeficiente de correlação de 0,51 e 0,71 com níveis de DON em grãos de cevada contaminados artificial e naturalmente, respectivamente. O método também detectou *Fusarium* spp. em grãos sem sinais de infecção, indicando sua maior precisão em comparação ao método de análise visual de giberela em plantas.

Hill et al.⁶⁸ compararam a eficiência do ELISA indireto⁵³ com a triagem visual e a análise de DON na avaliação da gravidade de giberela em amostras de cevada de diferentes localizações com diferentes condições ambientais. Os autores sugeriram que a quantificação de *Fusarium* spp. por ELISA é uma técnica precisa para avaliar a contaminação fúngica de cevada e apresenta menor coeficiente de variação quando comparado à análise de DON e do *score* de giberela.

Na tentativa de desenvolver um método específico para detecção de espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de fumonisinas, Grimm e Geisen⁶⁹ desenvolveram um PCR-ELISA, que apresentou maior especificidade quando comparado com os resultados da PCR, detectando todas as espécies potencialmente produtoras de fumonisinas estudadas e não apresentando reação com as espécies não produtoras de fumonisinas. Esse método consiste basicamente em realizar os procedimentos de um ELISA para detecção do produto de uma PCR. Os produtos da PCR são marcados com digoxigenina e incubados com sondas oligonucleotídicas marcadas com biotina que apresentam sequência complementar à sequência-alvo. Assim, caso os produtos da PCR apresentem essa sequência-alvo, ocorrerá a ligação específica desses produtos da PCR marcados com digoxigenina às sondas oligonucleotídicas marcadas com biotina. Esse híbrido é então capturado pela

estreptavidina presente nos poços da microplaca através da biotina, e os produtos não específicos da PCR, que não se ligam à sonda, são removidos por lavagens. Em seguida, o híbrido é incubado com conjugado antidigoxigenina-peroxidase, ocorrendo a ligação do conjugado com a digoxigenina presente nos produtos da PCR. Por fim, é adicionado um substrato que ao reagir com o conjugado enzimático resulta em um produto colorido que é analisado por espectrofotometria^{70,71}.

24.5 IMUNOENSAIOS PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS

24.5.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram descobertas em 1960, após a morte de aproximadamente 100 mil perus na Inglaterra (*Turkey X disease*) que consumiram ração contendo torta de amendoim contaminada proveniente do Brasil^{72,73}.

Estruturalmente, as aflatoxinas são bisfuranos ligados a um anel cumarínico central, sendo conhecidos ao menos 20 análogos, dos quais os principais são aflatoxina B₁ (AFB₁), AFB₂, AFG₁ e AFG₂^{74,75}. A AFB₁ é o análogo mais frequente e mais tóxico, seguido por AFG₁, AFB₂ e AFG₂, que exibem toxicidade de 50%, 20% e 10% em relação à AFB₁, respectivamente⁷⁶. As AFB₁ e AFG₁ contêm um anel diidrofurano, e as AFB₂ e AFG₂ contêm um tetradiidrofurano^{3,75}.

Os produtos agrícolas com maior risco de contaminação por aflatoxinas são amendoim, milho, castanha-do-pará, pistache, pimenta e figo³. A aflatoxina M₁ (AFM₁), que é um produto da metabolização da AFB₁ dos organismos de animais lactentes, é a forma mais frequente em leite e derivados⁷⁷.

Os efeitos tóxicos e carcinogênicos da AFB₁ são atribuídos aos derivados hidroxilados de metabolização pela monoxigenase citocromo P-450-dependente (CYP) nos hepatócitos. Essa enzima catalisa o metabolismo oxidativo da AFB₁, resultando na formação de vários derivados hidroxilados como a AFM₁ (mais frequente), AFQ₁ e AFP₁ (menor toxicidade), bem como a formação do AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), que é altamente reativo. A interação dos metabólitos da AFB₁ com DNA promove a formação principalmente de aduto macromolecular AFB₁-N⁷-guanina (8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-dihidroaflatoxina B₁)⁷⁸⁻⁸¹, que pode causar uma mutação somática pontual no gene TP53 (transversão GC para TA na terceira base do códon 249) resultando em mutação na proteína p53, que é considerada a alteração genética

mais comum associada ao câncer em seres humanos⁸²⁻⁸⁶. Adicionalmente, a AFB₁ pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais promovem a oxidação do DNA⁸⁷.

A intoxicação provocada pela ingestão de aflatoxinas, denominada aflatoxicose, pode ocorrer de forma aguda ou crônica em seres humanos e animais. A aflatoxicose aguda em seres humanos é caracterizada por febre alta, vômito, colúria, edema dos pés, icterícia, desenvolvimento de ascite, hipertensão portal e apresenta uma alta taxa de mortalidade^{88,89}. Além disso, duas doenças humanas de etiologia indefinida têm sido associadas ao consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas: Kwashiorkor e síndrome de Reye⁹⁰⁻⁹². Por outro lado, a exposição crônica está associada ao câncer hepático e pulmonar⁹³⁻⁹⁵, alterações na resposta imunológica⁹⁶ e diminuição na concentração de selênio plasmático⁹⁷.

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas em animais incluem redução do peso corporal e alterações na atividade de macrófagos em aves^{98,99}; redução do ganho de peso em suínos¹⁰⁰; hepatite, anorexia, coagulação intravascular disseminada, letargia e icterícia em cães e gatos¹⁰¹; carcinoma hepatocelular em ratos¹⁰²; redução do ganho de peso e redução na produção de leite em bovinos^{103,104}; lesão hepática e renal, alteração no metabolismo mineral e redução no ganho de peso em caprinos^{105,106}.

As aflatoxinas são classificadas pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como carcinógenos do grupo 1 (carcinogênico para seres humanos)¹⁰⁷. A AFB₁ é considerada o mais potente carcinógeno natural conhecido e, geralmente, o análogo mais produzido pelas cepas toxigênicas^{108,109}.

A Comissão Europeia estabeleceu limites máximos tolerados de 20,0 µg/Kg para aflatoxina B₁ em ração animal, com exceção de bovinos leiteiros e bezerros, ovelhas leiteiras e cordeiros, cabras e cabritos, leitões e aves (5,0 µg/Kg)¹¹⁰.

Não existe uma legislação para os limites máximos tolerados de aflatoxinas em ração animal no Brasil. No entanto o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas do Ministério da Agricultura recomendou um limite máximo de 20,0 µg/Kg para aflatoxinas totais em milho em grão e em subprodutos destinados à alimentação animal¹¹¹. O limite máximo recomendado para a aflatoxina B₁ em ração destinada a ruminantes é de 50,0 µg/Kg; para animais das demais espécies, incluindo ruminantes lactentes, de 20,0 µg/Kg, e para todas as espécies animais nas fases pré-inicial e inicial é de 10,0 µg/Kg (Tabela 24.1).

Em relação à alimentação humana, os limites máximos tolerados em diversos alimentos foram estabelecidos para aflatoxinas totais e aflatoxina B₁, separadamente. Em amendoim, avelã e castanha-do-pará o limite máximo tolerado para aflatoxinas totais e aflatoxina B₁ é de 15,0 µg/Kg e 8,0 µg/Kg, respectivamente; em cereais é de 4,0 e 2,0 µg/Kg, respectivamente; em milho e arroz, de 5,0 e 1,0 µg/Kg, respectivamente¹¹².

No Brasil, os limites máximos tolerados para aflatoxinas totais (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) foram estabelecidos para diversos alimentos destinados ao consumo humano¹⁴. Em cereais, este limite é de 5,0 µg/Kg; em castanha-do-pará varia de 10,0 µg/Kg a 20,0 µg/Kg; e em amendoim e em milho, incluindo farinha e semolina, é de 20,0 µg/Kg (Tabela 24.1).

Tabela 24.1 Limites máximos tolerados (LMT) para aflatoxinas em alimentos e rações. Fonte: Brasil (2006)¹¹¹ e Brasil (2011)¹⁴

| MICOTOXINA | ALIMENTOS | LMT (µg/Kg) |
|--|--|-------------|
| Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ | Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada | 5 |
| | Feijão | 5 |
| | Castanhas exceto castanha-do-brasil, incluindo nozes, pistaches, avelãs e amêndoas | 10 |
| | Frutas desidratadas e secas | 10 |
| | Castanha-do-brasil com casca para consumo direto | 20 |
| | Castanha-do-brasil sem casca para consumo direto | 10 |
| | Castanha-do-brasil sem casca para processamento posterior | 15 |
| | Alimentos à base de cereais para alimentação infantil | 1 |
| | Amêndoas de cacau | 10 |
| | Produtos de cacau e chocolate | 5 |
| | Amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim | 20 |
| | Milho, milho em grãos (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho | 20 |
| | RAÇÕES | |
| Aflatoxina B ₁ | Rações e concentrados para ruminantes adultos, exceto bovinos em lactação | 50 |
| | Rações e concentrados para demais espécies, incluindo bovinos em lactação | 20 |
| | Rações, concentrados e outros alimentos completos para animais de todas as espécies nas fases pré-inicial e inicial | 10 |

Diversos métodos imunológicos podem ser utilizados para detecção de aflatoxinas, incluindo o ELISA^{17,113-121}, imunocromatografia^{118,121-126}, *dipstick*^{30,127} e biossensores¹²⁸⁻¹³⁴.

Asis et al.¹¹³ desenvolveram um ic-ELISA para quantificação de aflatoxina B₁ em extrato de amendoim e pasta de amendoim. As amostras foram previamente contaminadas com *Aspergillus* spp. e analisadas por CLAE e por ic-ELISA. O coeficiente de correlação entre os dois métodos foi de 0,977, o limite de detecção de 0,5 µg/Kg e a taxa de recuperação de 107%.

Lipigorngoson et al.¹¹⁷ desenvolveram um dc-ELISA baseado em anticorpo monoclonal para detecção de aflatoxina B₁ em milho e amendoim. O limite de detecção foi de 4,0 µg/Kg, com taxa de recuperação de 88,1% e 99,5%. A comparação do dc-ELISA com kits comerciais de ELISA e com a cromatografia em camada delgada (CCD) apresentou um bom coeficiente de correlação, que foi de 0,912 e 0,802, respectivamente, para o milho, e de 0,941 e 0,832, respectivamente, para o amendoim.

Guan et al.¹¹⁵ desenvolveram um ic-ELISA baseado em anticorpo monoclonal sensível e específico para detectar AFM₁ em amostras de leite e produtos lácteos infantis. O anticorpo não apresentou reatividade cruzada contra a AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, e o limite de detecção foi de 3 ng/L e 6 ng/L para o leite e produtos lácteos, respectivamente. A taxa de recuperação variou entre 91% e 110%. O ensaio apresentou uma alta correlação (0,98) quando comparado com a CLAE.

Um ic-ELISA baseado em anticorpo monoclonal contra AFB₁ foi padronizado e validado para a detecção de aflatoxinas em ração de aves e comparado com a CLAE. O ic-ELISA mostrou uma boa linearidade (0,994) e um limite de detecção de 1,25 ng/g em ração de frangos de corte e de 1,41 ng/g em ração de galinhas poedeiras. A taxa de recuperação de AFB₁ foi 98% e 102% para a ração de frangos de corte e de galinhas poedeiras, respectivamente. O ic-ELISA apresentou uma boa correlação com a CLAE para ração de frangos de corte (0,97) e para ração de galinhas poedeiras (0,98) indicando ser um método eficiente para a triagem de aflatoxinas em rações de aves¹²⁰.

Liu et al.¹¹⁸ desenvolveram um dc-ELISA e uma imunocromatografia utilizando anticorpo marcado com ouro coloidal para a detecção de AFB₁ em café, arroz-vermelho (*red yeast rice*) e ração à base de milho. Os limites de detecção do dc-ELISA e da imunocromatografia foram de 0,02 ng/mL e 2,00 ng/mL, respectivamente. A imunocromatografia permitiu distinguir as amostras contaminadas com concentrações acima de 72,40 ng/g de AFB₁.

Zhang et al.¹²⁶ desenvolveram uma imunocromatografia baseada em um ensaio competitivo utilizando anticorpo monoclonal marcado com ouro coloidal, para a detecção qualitativa de aflatoxinas totais (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) em amendoim. Os limites de detecção foram de 0,03 ng/mL, 0,06

ng/mL, 0,12 ng/mL e 0,25 ng/mL para a AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente. O método apresentou alta sensibilidade, rapidez e baixo custo para a detecção qualitativa de aflatoxinas em amendoim.

Uma imunocromatografia utilizando anticorpo monoclonal conjugado a ouro coloidal e imobilizado em membrana de nitrocelulose foi desenvolvida para a detecção qualitativa de AFB₁ em ração para suínos, com um limite de detecção de 5,0 µg/Kg. A extração da amostra foi realizada utilizando uma mistura de metanol:água (80:20 v/v), e a tira de nitrocelulose foi imersa nesse extrato por 10 minutos, sendo que o conjugado se dissolveu e permaneceu no extrato. Em amostras positivas, a AFB₁ presente na amostra foi capaz de se ligar ao conjugado. Porém, em amostras negativas, o conjugado permaneceu livre e fluuiu ao longo da membrana. Ao atingir a linha teste, o conjugado livre se ligou à AFB₁ imobilizada, formando uma linha colorida. A linha controle presente na membrana assegura que o conjugado fluuiu ao longo da membrana e garante a validade do teste. Portanto, a presença de duas linhas coloridas (linha teste e controle) indica que a amostra contém uma concentração de AFB₁ menor que 5,0 µg/Kg. Por outro lado, a aparição de somente uma linha (linha controle) indica que a amostra está contaminada com concentrações acima de 5,0 µg/Kg. O método desenvolvido foi capaz de discriminar amostras positivas e negativas, indicando seu potencial para a triagem *in situ*³⁰.

Um imunossensor baseado em um imunoensaio competitivo indireto foi desenvolvido para a detecção de AFB₁ em cevada, utilizando um detector eletroquímico (*screen printed electrode*). O limite de detecção foi de 2,0 ng AFB₁/g de cevada, e a taxa de recuperação variou de 93% a 117% (média de 105% ± 8%) tanto para o ELISA espectrofotométrico quanto para o eletroquímico¹²⁸.

Um imunossensor desenvolvido pelo Naval Research Laboratory (*NLR biosensor array*) baseado em imunoensaio competitivo indireto foi utilizado para a detecção de AFB₁ em derivados de milho e em amendoim, nozes e manteiga de amendoim. A intensidade da fluorescência diminuiu com o aumento da concentração de AFB₁. O limite de detecção para amostras de pipoca, flocos de milho e farinha de milho variou de 1,5 ng/g a 5,1 ng/g, e, para amostras de amendoim, nozes e manteiga de amendoim, variou de 0,6 ng/g a 1,4 ng/g¹³².

Um imunossensor eletroquímico baseado na amplificação enzimática por deposição de prata foi desenvolvido para a detecção de AFB₁ em arroz. O imunossensor foi baseado em um imunoensaio competitivo indireto entre a AFB₁ livre e o conjugado AFB₁-soroalbumina bovina (AFB₁-BSA) imobilizado

na superfície do eletrodo para a ligação do anticorpo anti-AFB₁. O anticorpo anti-IgG marcado com fosfatase alcalina foi ligado à superfície do eletrodo por meio da ligação com o anticorpo anti-AFB₁ para converter o substrato, 2-fosfato de ácido ascórbico, em ácido ascórbico que reduz os íons prata em solução a metal de prata depositado na superfície do eletrodo. A voltametria de varredura linear foi utilizada para quantificar a prata depositada, a qual refletiu indiretamente a concentração do analito. O limite de detecção foi de 0,06 ng/mL, e a taxa de recuperação em amostras de arroz variou de 88,5% a 112%¹³⁴.

Um imunossensor, utilizando um *screen-printed electrode*, foi desenvolvido para a detecção de AFM₁ em leite. O método foi baseado na competição entre a AFM₁ presente nas amostras e o conjugado AFM₁-peroxidase pela ligação a um anticorpo monoclonal anti-AFM₁. Utilizando cronoamperimetria, o sinal gerado pelo uso de TMB (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina)/H₂O₂ foi monitorado para determinar a concentração de peroxidase e, consequentemente, a concentração de AFM₁ na amostra. Nesse método ocorreu um efeito de matriz devido à presença de proteínas de soro do leite. Após tratamento com cloreto de cálcio (18 mM), o problema foi eliminado e foi obtido um limite de detecção de 39 ng AFM₁/L. Comparado com os kits comerciais de ELISA, o imunossensor apresentou um limite de detecção similar e comparável repetitividade. A CLAE apresentou maior sensibilidade que o imunossensor, com limite de detecção de 10 ng/L. Esse método, porém, requer a utilização de colunas de imunoafinidade, aumentando os custos do método e tornando-o mais complexo¹³⁵.

24.5.2 Fumonisin

Estruturalmente, as fumonisinas consistem em uma cadeia linear com 19 ou 20 carbonos ramificados com grupos hidroxil, metil e ácidos tricarbóxicos em várias posições ao longo da cadeia¹³⁶. Ao menos 28 análogos de fumonisinas foram caracterizados e divididos em quatro grupos principais, identificados como fumonisinas das séries A, B, C e P¹³⁷. Os análogos da série B, incluindo as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃), são as mais tóxicas e abundantes em milho e derivados, sendo que a FB₁ é a mais frequente e detectada em maiores concentrações¹³⁸.

A FB₁ é um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e um 2-amino-12,16-dimetil, 3,5,10,14,15-penta-hidroxi-eicosano com grupos hidroxil esterificados com o grupo carboxiterminal dos ácidos em C-14 e C-15^{136,139}.

A atividade tóxica das fumonisinas está relacionada à similaridade da sua estrutura com as bases esfingoides (esfingosina e esfinganina)¹⁴⁰⁻¹⁴².

Devido a essa similaridade, as fumonisinas inibem competitivamente a ceramida sintase, principal enzima envolvida no metabolismo dos esfingolipídios e, conseqüentemente, causam o bloqueio da biossíntese da ceramida, aumento de esfinganina e, em menor proporção, de esfingosina, redução da reacilação das esfingosinas derivadas do *turnover* dos esfingolipídios, além da redução da degradação dos esfingolipídios da dieta¹⁴³⁻¹⁴⁶. Essas alterações estão associadas aos principais efeitos tóxicos das fumonisinas, que incluem a leucoencefalomalácia em equinos¹⁴⁷, edema pulmonar em suínos¹⁴⁸, efeitos hepatotóxico e hepatocarcinogênico em ratos¹⁴⁹, efeitos nefrocarcinogênicos em ratos¹⁵⁰ e redução do desenvolvimento em aves¹⁵¹. Além disso, estudos epidemiológicos com seres humanos indicam a associação das fumonisinas com o câncer esofágico na região de Transkei, África do Sul e China, câncer hepático primário^{50,152,153} e defeitos no tubo neural na Guatemala e no México¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou as fumonisinas como carcinógenos do grupo 2B(possivelmente carcinogênicos para seres humanos)¹⁰⁷.

Diversos países estabeleceram limites máximos tolerados para fumonisinas em alimentos e rações. A União Europeia recomendou um limite máximo tolerado de fumonisinas ($FB_1 + FB_2$) em milho e produtos derivados de milho destinados à alimentação animal de 60.000 µg/Kg¹⁵⁷. Para a alimentação humana, o limite tolerado para fumonisinas em milho não processado e alimentos à base de milho é de 1.000 µg/Kg, enquanto em cereais matinais e em alimentos infantis à base de milho é de 800 µg/Kg e 200 µg/Kg, respectivamente¹⁵⁸.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu um limite para fumonisinas de 2.500 µg/Kg, em 2012, para vários produtos derivados de milho (farinha de milho, creme de milho, flocos, fubá, canjica e canjiquinha) e de 2.000 µg/Kg para o amido e outros produtos à base de milho destinados ao consumo humano. Em 2017, os produtores de alimentos deverão se adequar à redução desses limites tolerados para fumonisinas, que deverá ser de 1.500 µg/Kg e 1.000 µg/Kg, respectivamente. Em 2014, o limite máximo tolerado para milho em grãos foi estabelecido em 5.000 µg/Kg¹⁴ (Tabela 24.2).

Tabela 24.2 Limites máximos tolerados (LTM) para fumonisinas em alimentos e rações. Fonte: Brasil (2006)¹¹¹ e Brasil (2011)¹⁴

| MICOTOXINA | ALIMENTOS | LMT (µg/Kg) |
|---|--|-------------|
| Fumonisin (B ₁ + B ₂) | Milho de pipoca | 2.000 |
| | Alimentos à base de milho para alimentação infantil | 200 |
| | Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha | 2.500 |
| | Amido de milho e outros produtos à base de milho | 2.000 |
| | Milho em grãos para posterior processamento | 5.000 |
| | RAÇÕES | |
| | Rações e concentrados para monogástricos, exceto aves domésticas | 5.000 |
| | Rações e concentrados para aves domésticas | 10.000 |

Não há uma legislação sobre os limites máximos tolerados de fumonisinas em ração animal no Brasil. No entanto, em 2006, foi criado o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas pelo Ministério da Agricultura que recomendou um limite máximo tolerado de fumonisinas em milho e trigo em grãos ou seus subprodutos destinados à alimentação animal de 10.000 µg/Kg¹¹¹. O limite máximo recomendado para ração animal destinada a animais monogástricos é de 5.000 µg/Kg (Tabela 24.2).

Diversos métodos imunológicos, tais como ELISA, imunossensores, *dipstick* e imunocromatografia, têm sido desenvolvidos para a detecção de fumonisinas, especialmente para a triagem da contaminação de matérias-primas. Anticorpos monoclonais e policlonais têm sido utilizados para o desenvolvimento de dc-ELISA e ic-ELISA para a detecção de fumonisinas^{22,159-162}.

Sydenham et al.¹⁶² avaliaram a contaminação por fumonisinas em milho utilizando um dc-ELISA comercial baseado em anticorpo monoclonal (Agri Screen dc-ELISA). Apesar da superestimação da contaminação natural do milho em 50%, uma alta correlação (0,996) entre dc-ELISA e CLAE foi obtida utilizando milho artificialmente contaminado com fumonisinas com concentração variando de 0,8 µg/g a 12,8 µg/g.

Yeung et al.¹⁶³ desenvolveram um ic-ELISA baseado em anticorpo policlonal para a detecção de fumonisinas em milho. A reatividade cruzada ocorreu para FB₁ (100%), FB₂ (55%), FB₃ (13%) e para os hidrolisados de fumonisinas HFB₁ (11%) e HFB₂ (3%). Contudo, não houve reatividade cruzada com outras micotoxinas. O limite de detecção em milho foi de 5,0 ng/mL, e

a concentração de fumonisinas detectada em milho naturalmente contaminado variou de 10,0 ng/g a 500,0 ng/g.

Ono et al.²² desenvolveram um ic-ELISA baseado em anticorpo monoclonal para a detecção de fumonisinas em amostras de milho. O coeficiente de correlação entre a CLAE e o ELISA foi de 0,94, com um limite de detecção de 93,0 ng/g, indicando que é um método eficaz para a triagem da contaminação de milho por fumonisinas.

Um dc-ELISA baseado em anticorpo monoclonal foi desenvolvido para a detecção de FB₁ em cereais. O limite de detecção foi de 7,6 ng/mL e as reatividades cruzadas para a FB₁, FB₂ e FB₃ foram de 100,0%, 91,8% e 209,0%, respectivamente. Contudo, não houve reatividade cruzada com hidrolisados de fumonisinas. A taxa de recuperação variou de 61% a 84% utilizando concentrações de 50 ng/g a 200 ng/g, e a análise comparativa de milho naturalmente contaminado mostrou que o método é adequado para a triagem rápida de cereais e rações¹⁶⁰.

Kim et al.¹⁶⁴ analisaram a ocorrência de FB₁ em amostras de alimentos derivados de milho provenientes de Seul, Coreia do Sul, utilizando um dc-ELISA comercial. O limite de detecção foi de 5,0 ng/g, e a taxa de recuperação de amostras contaminadas artificialmente com concentrações de 10 ng/g a 1.000 ng/g de FB₁ foi de 104%, e, além disso, apresentou uma alta correlação com a CLAE (0,992).

Quan et al.¹⁶⁵ desenvolveram um ELISA quimioluminescente a fim de aumentar a sensibilidade do imunoensaio. Nesse imunoensaio, após a reação de competição utilizando anticorpo policlonal, foi adicionado um reagente quimioluminescente. O limite de detecção foi de 0,09 µg/L, 10 vezes mais baixo que o dc-ELISA convencional. A taxa de recuperação em milho foi de 93,66% utilizando as concentrações de 100 µg, 250 µg e 500 µg de FB₁/Kg.

Wang et al.¹⁶⁶ desenvolveram um teste rápido de ic-ELISA baseado em anticorpo policlonal, para a detecção de fumonisinas em diversos grãos (milho, cevada, amendoim, arroz e sorgo). O limite de detecção foi de 0,5 µg/L, e a análise foi realizada em apenas 20 minutos.

Anticorpos policlonais para fumonisinas foram utilizados para o desenvolvimento de um dc-ELISA. O limite de detecção para a FB₁ foi de 0,05 ng/mL, e a reatividade cruzada do anticorpo com a FB₁, FB₂ e FB₃ foi de 100%, 70% e 0,5%. De 15 amostras analisadas (alimentos derivados de cereais e rações), 12 estavam contaminadas com concentrações que variaram de 2 ng/g a 2.170 ng/g, confirmadas por CLAE¹⁶¹.

Sheng et al.¹⁶⁷ produziram um anticorpo monoclonal para o desenvolvimento de um ic-ELISA para a detecção de FB₁ em milho. O anticorpo

monoclonal apresentou reatividade cruzada com a FB₂ e reatividade cruzada insignificante com outras micotoxinas. O limite de detecção foi 5,4 µg/Kg, e a taxa de recuperação a partir de amostras de milho contaminadas artificialmente com FB₁ (100 µg/Kg a 500 µg/Kg) variou de 101 ± 7% a 107 ± 4%. A análise de amostras de milho naturalmente contaminadas pelo ic-ELISA foi comparado com o LC/MS e apresentou um coeficiente de correlação de 0,82, indicando que o ic-ELISA pode ser utilizado para a triagem de amostras de milho, antes da confirmação por um método instrumental.

Alguns métodos imunocromatográficos foram desenvolvidos para a triagem rápida da contaminação por fumonisinas em cereais^{27,28,168,169}.

Li et al.²⁷ desenvolveram uma imunocromatografia baseada em anticorpo monoclonal conjugado com ouro para a detecção de fumonisinas (FB₁, FB₂ e FB₃) em milho, com um limite de detecção de 2,5 ng/mL. As amostras de milho contaminadas artificialmente com fumonisinas (2,5 ng/mL a 40 ng/mL) apresentaram uma boa correlação com LC/MS, indicando que o teste pode ser utilizado na avaliação semiquantitativa de fumonisinas *in-situ*.

Para a avaliação quantitativa, a intensidade das linhas teste presentes na membrana tem sido avaliada por meio de um leitor fotométrico para determinar a concentração de FB₁ com base em uma curva de calibração. O limite de detecção para a FB₁ foi de 5,23 ng/mL, e o método apresentou uma boa correlação (0,96) com o LC-MS/MS, indicando que além de ser um método rápido também pode ser utilizado para o monitoramento de FB₁²⁸.

Um *dipstick* comercial baseado em um imunoensaio competitivo indireto foi utilizado para a detecção qualitativa de fumonisinas e outras micotoxinas de *Fusarium* spp. (zearalenona, toxina T-2 e desoxinivalenol) em milho. Os extratos das amostras dos cereais foram adicionados em micropoços contendo os anticorpos antifumonisinas e antianticorpo conjugado a um complexo de proteína A-ouro, para a linha controle. O *dipstick*, contendo a linha teste composta de conjugado de FB₁-albumina bovina foi imerso na amostra para que ocorresse a competição. A concentração mínima de fumonisinas detectada em milho foi de 3.200 µg/Kg, 80% da concentração máxima tolerada pela legislação europeia. Portanto, somente amostras com concentrações acima de 3.200 µg/Kg foram consideradas positivas. A detecção das micotoxinas em milho naturalmente contaminado apresentou uma boa correlação com o LC/MS, indicando que o *dipstick* é um método rápido (30 minutos) e de baixo custo para a triagem de micotoxinas em grãos³².

Nos últimos anos, os biossensores têm sido utilizados como uma alternativa promissora devido à alta sensibilidade, seletividade, simplicidade, facilidade de uso, baixo custo e, em alguns casos, a possibilidade de integração

com dispositivos automatizados e portáteis¹⁹. Os biossensores mais utilizados para a detecção de micotoxinas são baseados em imunoensaio competitivo ou não competitivo acoplados a diferentes tipos de detectores. Imunossensores acoplados a detectores eletroquímicos¹⁷⁰, ópticos^{171,172} e quimioluminescentes³⁴ têm sido desenvolvidos para a detecção de fumonisinas.

Um biossensor, integrando um imunoensaio de fluxo lateral acoplado a um detector de quimioluminescência enzimática e a um dispositivo de carga-acoplada (DCA) de alta sensibilidade, foi desenvolvido para a detecção de fumonisinas (FB₁ e FB₂) em milho. Nesse imunoensaio que utilizava tiras de fluxo lateral, uma solução contendo os anticorpos antifumonisinas, os anticorpos conjugados à enzima e extrato das amostras de milho foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose, seguido de migração ao longo da membrana por capilaridade até atingir as zonas teste e controle. Após a adição de um substrato quimioluminescente, o sinal foi detectado por um DCA, e a determinação da concentração de fumonisinas realizada por meio dos fótons emitidos nas zonas teste e controle. O limite de detecção foi de 2,5 µg fumonisinas/L, e a faixa de trabalho de 25 µg a 5.000 µg de fumonisinas/Kg. A taxa de recuperação do método foi de 95% a 115%³⁴.

24.6 PROTOCOLOS

24.6.1 ELISA competitivo indireto para detecção de exoantígeno de *Fusarium* spp. em milho⁵⁴

Preparação das amostras

- Misturar 10 g de amostra de milho triturado (granulometria de 50 *mesh*) a 90 mL de PBS (Salina tamponada com fosfato) 0,15 M estéril.
- Filtrar a suspensão de milho com papel filtro Whatman nº 1.
- Armazenar o filtrado a -20 °C até o momento de uso.

ELISA competitivo indireto

- Sensibilizar a microplaca com 100 µL de exoantígeno de *F. verticillioides* em tampão carbonato bicarbonato 0,2 M pH 9,6, a 4 °C por 16 horas.
- Lavar três vezes com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T).

- Bloquear a microplaca com 150 µL de PBS-leite desnatado 1% por 3 horas a 25 °C.
- Lavar três vezes com PBS-T.
- Incubar com 50 µL de soro imune anti-*F. verticillioides* diluído em PBS-leite desnatado 1% e 50 µL do filtrado da amostra de milho por 16 horas a 4 °C.
- Lavar com PBS-T.
- Incubar com 100 µL de conjugado anti-IgG-peroxidase por 1,5 horas a 25 °C.
- Lavar com PBS-T.
- Incubar com 100 µL de solução de substrato (H_2O_2 / 3,3',5,5'-tetra-metilbenzidina) a 25 °C.
- Adicionar 50 µL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 M.
- Determinar a absorvância (450 nm).

Observação: a concentração de exoantígeno utilizada na sensibilização da microplaca e as diluições do soro e do conjugado deverão ser previamente padronizadas.

24.6.2 ELISA competitivo indireto para detecção de fumonisinas em milho²²

Preparação das amostras

- Misturar 10 g de amostra de milho triturado (granulometria de 50 mesh) com 30 mL de metanol: água (3:1, v/v) e centrifugar 10.000 × g.
- Diluir o sobrenadante com PBS 0,15 M (é necessário padronizar a diluição de acordo com os níveis de contaminação).

ELISA competitivo indireto

- Sensibilizar a microplaca com o conjugado FB₁-ovalbumina (100 µL) em PBS a 4 °C por 16 horas.
- Lavar três vezes com PBS-Tween 20 0,05%.
- Bloquear a microplaca com 150 µL de PBS-leite desnatado 5% por 16 horas a 4 °C.
- Lavar três vezes com PBS-Tween 20 0,05% e adicionar 50 µL de padrões de FB₁ ou do extrato diluído das amostras de milho e 50 µL

de anticorpo monoclonal anti-FB₁ em PBS, incubar por 16 horas a 4 °C.

- Lavar três vezes com PBS-Tween 20 0,05% e adicionar 100 µL de anticorpo anti-IgG-peroxidase, incubar a 25 °C por 1 hora e lavar conforme descrito anteriormente.
- Adicionar 100 µL de substrato (H₂O₂ / 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). Após 45 minutos a 25 °C, bloquear a reação adicionando 50 µL de H₂SO₄ 1M e determinar a absorvância a 450 nm (leitora de ELISA). Calcular a absorvância média das absorvâncias individuais obtidas de duplicata e expressar os resultados em porcentagens de ligação:

$$\text{(Equação 24.1)} \quad \text{Ligação (\%)} = (A^+ / A^-) \times 100$$

em que A⁺ é a absorvância média na presença de cada amostra ou padrão e A⁻ é a absorvância média na sua ausência. A concentração de fumonisinas é determinada utilizando uma curva padrão (0,2 ng/mL a 5,0 ng/mL de FB₁) plotada em porcentagem de ligação contra a concentração de FB₁ transformada em log.

Observação: a concentração de conjugado FB₁-ovalbumina utilizada na sensibilização da microplaca e as diluições do anticorpo e do conjugado deverão ser previamente padronizadas.

24.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos imunológicos para a triagem da contaminação de grãos, alimentos e rações por fungos toxigênicos e micotoxinas proporcionam análises com alta sensibilidade, precisão, rapidez e baixo custo. O imunoensaio ELISA para exoantígenos permite a detecção semiquantitativa de fungos toxigênicos. O ELISA é um dos métodos imunológicos mais utilizados para a detecção de micotoxinas; porém, as possíveis reações falso positivas impedem que esse método seja reconhecido como um método oficial pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), tornando necessária a confirmação dos resultados por métodos químicos. Métodos rápidos como a imunocromatografia e o *dipstick* reduzem consideravelmente o tempo da análise e contribuem para a avaliação qualitativa da contaminação de amostras de forma precisa. Atualmente há disponibilidade de kits comerciais baseados em ELISA, imunocromatografia e *dipstick* para a detecção das principais

micotoxinas. Os biossensores constituem uma alternativa promissora para a detecção quantitativa *in situ* de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos com alta sensibilidade. Um dos desafios para o desenvolvimento de novos métodos para detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas está atrelado à produção de anticorpos altamente específicos para a aplicação em dispositivos portáteis que permitam a análise *in situ*. O controle da qualidade de grãos, alimentos e rações depende da disponibilidade de métodos rápidos, sensíveis, confiáveis e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

1. Magan N, Olsen M. Mycotoxins in Food: Detection and Control. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd; 2004.
2. Smith JEM, Moss O. Mycotoxins, formation, analysis and significance. Chichester: Wiley; 1985.
3. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). Mycotoxins: risks in plants, animal and human systems. Task force report. Report n. 139. Ames: Iowa; 2003.
4. Ono EYS, Silva M, Hashimoto EH, Vizoni E, Kawamura O, Sugiura Y, Hirooka EY. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. Food Addit Contam. 2008;25:1392-9.
5. Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Osweiler GD, Rice LG, Plattner RD, Wilson TM. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. Appl Environ Microbiol. 1990;56:3225-6.
6. Goto T, Wicklow DT, Ito Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. Appl Environ Microbiol. 1996;62:4036-8.
7. Klich MA, Mullaney EJ, Daly CB, Cary JW. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamaris* and *A. ochraceoroseus*. Appl Microbiol Biotechnol. 2000;53:605-9.
8. Borutova R, Aragon YA, Nährer K, Berthiller F. Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010. Anim Feed Sci Technol. 2012;178:190-7.
9. Queiroz VAV, Alves GLO, Conceição RRP, Guimarães LJ, Mendes SM, Ribeiro PEA, Costa RV. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. Food Control. 2012;28:83-6.
10. Rossi CN, Takabayashi CR, Ono MA, Bordini JG, Kawamura O, Vizoni E, Hirooka EY, Ono EYS. Assessment of exposure of broiler chicken in Brazil to mycotoxins through naturally contaminated feed. Food Sec. 2013;5:541-50.
11. Ono EYS, Ono MA, Funo FY, Medina AE, Oliveira TCRM, Kawamura O, Ueno Y, Hirooka EY. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. Food Addit Contam. 2001;18:719-29.
12. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Rome, Italy; 2004.
13. Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA n. 7. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 1988 Nov 9; Seção I. p. 21968.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 7. 2011 Feb 18. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para

micotoxinas em alimentos. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 2011 Feb 22. Seção I. p. 72.

15. Pitt J, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. 3. ed. New York City: Springer; 2009.
16. Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Zeller KA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Leslie JF. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Appl Environ Microbiol. 2000;66:4378-82.
17. Kolosova AY, Shim W, Yang Z, Eremin SA, Chung D. Direct competitive ELISA based on monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁ – stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. Anal Bioanal Chem. 2006;384:286-94.
18. Valenta H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. J Chromatogr A. 1998;15:75-92.
19. Campàs M, Garibo D, Prieto-Simón B. Novel nanobiotechnological concepts in electrochemical biosensors for the analysis of toxins. Analyst. 2012;137:1055-67.
20. Gilbert J, Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. Trends Analyt Chem. 2002;21:468-86.
21. Krska R, Molinelli A. Mycotoxin analysis: State of the art and future trends. Anal Bioanal Chem. 2007;387:145-8.
22. Ono EYS, Kawamura O, Ono MA, Ueno Y, Hirooka EY. A Comparative Study of Indirect Competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. Food Agric Immunol. 2000;12:5-14.
23. Zheng M, Richard J, Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. Mycopathologia. 2006;161:261-73.
24. Hefle SL. Immunoassay fundamentals. Food Technol. 1995;49:102-7.
25. Lin HH, Cousin MA. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in foods. J Food Sci. 1987;52:1089-94.
26. Urusov AE, Zherdev AV, Dzantiev BB. Immunochemical methods of mycotoxin analysis (Review). Appl Biochem Microbiol. 2010;46:253-66.
27. Li YS, Zhou Y, Lu SY, Guo DJ, Ren HL, Meng XM, Zhi BH, Lin C, Wang Z, Lia XB, Liu ZS. Development of a one-step test strip for rapid screening of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in maize. Food Control. 2012;24:72-7.
28. Wang YK, Yan YX, Ji WH, Wang H, Li SQ, Zou Q, Sun JH. Rapid simultaneous quantification of Zearalenone and Fumonisin B₁ in corn and wheat by lateral flow dual immunoassay. J Agric Food Chem. 2013;61:5031-6.
29. Goryacheva IY, Saeger SD, Eremin SA, Van Peteghem C. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review. Food Addit Contam. 2007;24:1169-83.
30. Delmulle BS, De Saeger SMDG, Sibanda L, Barna-Vetro I, Van Peteghem CH. Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of Aflatoxin B₁ in pig feed. J Agric Food Chem. 2005;53:3364-8.

31. Krska R, Molinelli A. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393:67-71.
32. Lattanzio VMT, Nivarlet N, Lippolis V, Gatta SD, Huet AC, Delahaut P, Granier B, Visconti A. Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Anal Chim Acta.* 2012;718:99-108.
33. Lattanzio VMT, Von Holst C, Visconti A. Experimental design for in-house validation of a screening immunoassay kit. The case of a multiplex dipstick for *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405:7773-82.
34. Mirasoli M, Buragina A, Dolci LS, Simoni P, Anfossi L, Giraudi G, Roda A. Chemiluminescence-based biosensor for fumonisins quantitative detection in maize samples. *Biosens Bioelectron.* 2012;32:283-7.
35. Diener UL, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee SL, Klich ML. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann Rev Phytopathol.* 1987;25:249-70.
36. Diener UL, Davis ND. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *J Am Oil Chem Soc.* 1967;44:159-63.
37. Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst. Appl Microbiol.* 2005;28:442-53.
38. Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. *Stud Mycol.* 2011;69:57-80.
39. Warnock DW. Use of immunofluorescence to detect mycelium of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium* in barley grains. *Trans Br Mycol Soc.* 1973; 61: 547-52.
40. Tsai G-J, Yu S-C. Detecting *Aspergillus parasiticus* in cereals by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Food Microbiol.* 1999;50:181-9.
41. Yong RK, Cousin MA. Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. *Int J Food Microbiol.* 2001;65:27-38.
42. Lin HH, Lister RM, Cousin MA. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mould in tomato puree. *J Food Sci.* 1986;51:180-3, 192.
43. Tsai GJ, Cousin MA. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in cheese and yogurt. *J Dairy Sci.* 1990;73:3366-78.
44. Shapira R, Paster N, Menasherow M, Eyal O, Mett A, Meiron T, Kuttin E, Salomon R. Development of polyclonal antibodies for detection of aflatoxigenic molds involving culture filtrate and chimeric proteins expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:990-5.
45. Villamizar RA, Maroto A, Rius FX. Rapid detection of *Aspergillus flavus* in rice using biofunctionalized carbon nanotube field effect transistors. *Anal Bioanal Chem.* 2011;399:119-26.

46. Villamizar RA, Braun J, Gompf B, Dressel M, Rius FX. Morphological and electrical characteristics of biofunctionalized layers on carbon nanotubes. *Biosens Bioelectron.* 2009;25:161-6.
47. Sun X, Yan L, Tang Y, Zhang Y. A rapid and specific immunosensor for the detection of aflatoxigenic *Aspergilli*. *Eur Food Res Technol.* 2012;234:1013-21.
48. Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham EW, Shephard GS, Gelderblom WCA, Nieuwenhuis JJ. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:1089-93.
49. Gelderblom WC, Jackiewicz K, Marasas WF, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NP. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54:1806-11.
50. Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GG, Schalkwyk DJV. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology.* 1992;82:353-7.
51. Weibking T, Ledoux DR, Bermudez AJ, Turk JR, Rottinghaus GE, Wang E, Merrill AH. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. *Poult Sci.* 1993;72:456-66.
52. Chala A, Weinert J, Wolf GA. An integrated approach to the evaluation of the efficacy of fungicides against *Fusarium culmorum*, the cause of Head Blight of wheat. *J Phytopathol.* 2003;151:673-8.
53. Hill N, Schwarz P, Dahleen LS, Neate SM, Horsley R, Glenn AE, O'Donnell K. ELISA analysis for *Fusarium* in barley: Development of methodology and field assessment. *Crop Sci.* 2006;46:2636-42.
54. Meirelles PG, Ono MA, Ohe MCT, Maroneze DM, Itano EN, Garcia GT, Sugiura Y, Ueno Y, Hirooka EY, Ono EYS. Detection of *Fusarium* sp. contamination in corn by enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Agric Immunol.* 2006;17:79-89.
55. Miedaner T, Beyer W, Höxter H, Geiger HH. Growth stage specific resistance of winter rye to *Microdochium nivale* and *Fusarium* spp. in the field assessed by immunological methods. *Phytopathology.* 1994;85:416-21.
56. Miedaner T, Schneider B, Oettler G, Rohde S, Rabenstein F. Estimation of deoxynivalenol (DON) content by symptom rating and exoantigen content for resistance selection in wheat and triticale. *Euphytica.* 2004;139:123-32.
57. Rohde S, Rabenstein F. Standardization of an indirect PTA-ELISA for detection of *Fusarium* spp. in infected grains. *Mycotoxin Res.* 2005;21:100-4.
58. Sliková S, Sudyová V, Martinek P, Polišenská I, Gregová E, Mihálik D. Assessment of infection in wheat by *Fusarium* protein equivalent levels. *Eur J Plant Pathol.* 2009;124:163-70.

59. Gan Z, Marquardt R, Abramson D, Clear RM. The characterization of chicken antibodies raised against *Fusarium* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Int J Food Microbiol.* 1997;38:191-200.
60. Kaufman L, Standard PG. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:209-25.
61. Notermans S, Heuvelman CJ. Immunological detection of moulds in food by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); preparation of antigens. *Int J Food Microbiol.* 1985;2:247-58.
62. De Ruiter GA, Notermans SHW, Rombouts FM. New methods in food mycology. *Trends Food Sci Technol.* 1993;4:91-7.
63. Abramson D, Gan Z, Clear RM, Gilbert J, Marquardt RR. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *Int J Food Microbiol.* 1998;45:217-24.
64. Bottalico A, Perrone G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol.* 2002; 108: 611-24.
65. Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Bottalico A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur J Plant Pathol.* 2002;108:597-609.
66. Iyer MS, Cousin MA. Immunological detection of *Fusarium* species in cornmeal. *J Food Prot.* 2003;66:451-6.
67. Biazon L, Meirelles PG, Ono MA, Itano EN, Taniwaki M, Sugiura Y, Ueno Y, Hirooka EY, Ono EYS. Development of polyclonal antibodies against *Fusarium verticillioides* exoantigens. *Food Agric Immunol.* 2006;17:69-77.
68. Hill NS, Neate SM, Cooper B, Horsley R, Schwarz P, Dahleen LS, Smith KP, O'Donnell K, Reeves J. Comparison of ELISA for *Fusarium*, visual screening, and deoxynivalenol analysis of *Fusarium* Head Blight for barley field nurseries. *Crop Sci.* 2008;48:1389-98.
69. Grimm C, Geisen R. A PCR-ELISA for detection of potential fumonisin producing *Fusarium* species. *Lett Appl Microbiol.* 1998;26:456-62.
70. Poljak M, Seme K. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods.* 1996;56:231-8.
71. Whitby JE, Heaton PR, Whitby HE, O'Sullivan E, Johnstone P. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods.* 1997;69:63-72.
72. Blount W. Turkey "X" disease. *Turkeys.* 1961;9:52-58, 61, 67.
73. Asao T, Buchi G, Abdel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. Aflatoxins B and G. *J Am Chem. Soc.* 1963;85:1706-7.
74. Hartley RD, Nesbitt BF, O'Kelly J. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature.* 1963;198:1056-8.

75. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 2001;167:101-34.
76. Bennet JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:497-516.
77. Van Egmond HP. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard method of sampling and analysis. *Food Addit Contam*. 1989;6:139-88.
78. Benasutti M, Ejadi S, Whitlow MD, Loechler EL. Mapping the binding site of aflatoxin B₁ in DNA: Systematic analysis of the reactivity of aflatoxin B₁ with guanines in different DNA sequences. *Biochemistry*. 1988;27:472-81.
79. Croy RG, Essigmann JM, Reinhold VN, Wogan GN. Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75:1745-9.
80. Croy RG, Wogan GN. Quantitative comparison of covalent aflatoxin-DNA adducts formed in rat and mouse livers and kidneys. *J Natl Cancer Inst*. 1981;66:761-8.
81. Essigmann JM, Croy RG, Nadzan AM, Busby WF, Reinhold VN, Büchi G, Wogan GN. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:1870-4.
82. Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. Aflatoxin B₁ induces the transversion of G → T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:8586-90.
83. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991;350:429-31.
84. Cariello NF, Cui L, Skopek TR. *In vitro* mutational spectrum of aflatoxin B₁ in the human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene. *Cancer Res*. 1994;54:4436-41.
85. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*. 1993;329:1318-27.
86. Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res*. 1991;51:6185-9.
87. Guindon KA, Bedard LL, Massey TE. Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA from isolated mouse lung cells following *in vivo* treatment with aflatoxin B₁. *Toxicol Sci*. 2007;98:57-62.
88. Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Giesecker K, Rogers HS, Kieszak S, Njapau H, Schleicher R, McCoy LF, Misore A, DeCock K, Rubin C, Slutsker L, Aflatoxin Investigative Group. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environ Health Perspect*. 2005;113:1779-83.
89. Krishnamachari KA, Nagarajan V, Bhat RV, Tilak TBG. Hepatitis due to aflatoxicosis: An outbreak in Western India. *Lancet*. 1975;1:1061-3.

90. Becroft DM, Webster DR. Aflatoxins and Reye's disease. *Br Med J*. 1972;4:117.
91. Hendrickse RG. The influence of aflatoxins on child health in the tropics with particular reference to kwashiorkor. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78:427-35.
92. Shank RC, Bourgeois CH, Keschamras N, Chandavimol P. Aflatoxins in autopsy specimens from Thai children with an acute disease of unknown aetiology. *Food Cosmet Toxicol*. 1971;9:501-7.
93. Kelly JD, Eaton DL, Guengerich FP, Coulombe RA. Aflatoxin B₁ activation in human lung. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;144:88-95.
94. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, Wogan GN, Groopman JD. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3:3-10.
95. Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, Groopman JD, Gao YT, Henderson BE. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 1992;339:943-6.
96. Turner PC, Moore SE, Hall AJ, Prentice AM, Wild CP. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian Children. *Environ Health Perspect*. 2003;111:217-20.
97. Chen SY, Chen CJ, Tsai WY, Ahsan H, Liu TY, Lin JT, Santella RM. Associations of plasma aflatoxin B₁-Albumin adduct level with plasma selenium level and genetic polymorphisms of Glutathione S-Transferase M1 and T1. *Nutr Cancer*. 2000;38:179-85.
98. Neldon-Ortiz DL, Qureshi MA. Direct and microsomal activated aflatoxin B₁ exposure and its effects on turkey peritoneal macrophage functions *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991;109:432-42.
99. Smith EE, Kubena LF, Braithwaite CE, Harvey RB, Phillips TD, Reine AH. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult Sci*. 1992;71:1136-44.
100. Harvey RB, Huff WE, Kubena LF, Corrier DE, Phillips TD. Progression of aflatoxicosis in growing barrows. *Am J Vet Res*. 1988;49:482-7.
101. Newberne PM, Russo R, Wogan GN. Acute toxicity of aflatoxin B₁ in the dog. *Pathol Vet*. 1966;3:331-40.
102. Wogan GN, Paglialunga S, Newberne PM. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B₁ in rats. *Food Cosmet Toxicol*. 1974;12:681-5.
103. Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Response of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. *J Dairy Sci*. 1982;65:1503-8.
104. Helferich WG, Garrett WN, Hsieh DPH, Baldwin RL. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J Anim Sci*. 1986;62:691-6.

105. Fernández A, Belío R, Ramos JJ, Sanz MC, Sáez T. Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet. *J Sci Food Agric.* 1997;74:161-8.
106. Fernández A, Hernández M, Verde MT, Sanz M. Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *Can J Vet Res.* 2000;64:53-8.
107. IARC- International Agency for Research on Cancer. Some mycotoxins – Aflatoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2002;82:171-301.
108. Squire RA. Ranking animal carcinogens: A proposed regulatory approach. *Science.* 1981;214:877-80.
109. Wogan GN, Edwards GS, Newberne PM. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Res.* 1971;31:1936-42.
110. Commission Regulation (EU). n. 574/2011, amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, Ambrosio spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomonostats and consolidating Annexes I and II thereto *Official Journal of the European Union*, L159/7-L159/24. 2011 Jun 16.
111. Brasil. Portaria n. 130. 2006 May 24. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. Brasília: Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 2006 May 25. Seção II. p. 5.
112. Comissão Europeia. Regulamento (UE) n. 165/2010. 2010 Feb 26. Altera o Regulamento (CE) n. 1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que diz respeito às aflatoxinas. *Jornal Oficial da União Europeia*; 2010. L50/8-L50/12.
113. Asis R, Di Paola RD, Aldao MAJ. Determination of aflatoxin B₁ in highly contaminated peanut samples using HPLC and ELISA. *Food Agric Immunol.* 2002;14:201-8.
114. Edupuganti SR, Edupuganti OP, Hearty S, O’Kennedy R. A highly stable, sensitive, regenerable and rapid immunoassay for detecting aflatoxin B₁ in corn incorporating covalent AFB₁ immobilization and a recombinant Fab antibody. *Talanta.* 2013;115:329-35.
115. Guan D, Li P, Zhang Q, Zhang W, Zhang D, Jiang J. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M₁ in milk and infant milk products. *Food Chem.* 2011;125:1359-64
116. Kawamura O, Nagayama S, Sato S, Ohtani K, Ueno I, Ueno Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ in peanut products. *Mycotoxin Res.* 1988;4:75-88.
117. Lipigorngoson S, Ali N, Yoshizawa T. Limited survey for aflatoxin contamination of rice imported into Japan. *Micotoxins.* 2003;53:95-101.

118. Liu BH, Hsu YT, Lu CC, Yu FY. Detecting aflatoxin B₁ in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*. 2013;30:184-9.
119. Radoi A, Targa M, Prieto-Simon B, Marty J-L. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M₁ detection. *Talanta*. 2008;77:138-43.
120. Rossi CN, Takabayashi CR, Ono MA, Saito GH, Itano EN, Kawamura O, Hirooka EY, Ono EYS. Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed. *Food Chem*. 2012;132:2211-6.
121. Wang JJ, Liu BH, Hsu YT, Yu FY. Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M₁ in milk. *Food Control*. 2011;22:964-9.
122. Li X, Li P, Zhang Q, Li R, Zhang W, Zhang Z, Ding X, Tang X. Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone in agro-food. *Biosens Bioelectron*. 2013;49:426-32.
123. Xiulan S, Xiaolian Z, Jian T, Xiaohong G, Jun Z, Chu FS. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B₁ in foods. *Food Control*. 2006;17:256-62.
124. Zhang D, Li P, Liu W, Zhao L, Zhang Q, Zhang W, Ding X, Wang J. Development of a detector-free semiquantitative immunochromatographic assay with major aflatoxins as target analytes. *Sens Actuators B Chem*. 2013;185:432-7.
125. Zhang D, Li P, Yang Y, Zhang Q, Zhang W, Xiao Z, Ding X. A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B₁. *Talanta*. 2011;85:736-42.
126. Zhang D, Li P, Zhang Q, Zhang W. Ultrasensitive nanogold probe-based immunochromatographic assay for simultaneous detection of total aflatoxins in peanuts. *Biosens Bioelectron*. 2011;26:2877-82.
127. Tang D, Saucedo JC, Lin Z, Ott S, Basova E, Goryacheva I, Biselli S, Lin J, Niessner R, Knopp D. Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B₂ in food. *Biosens Bioelectron*. 2009;25:514-8.
128. Ammida NHS, Micheli L, Palleschi G. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B₁ in barley. *Anal Chim Acta*. 2004;520:159-64.
129. Bacher G, Pal S, Kanungo L, Bhand S. A label-free silver wire based impedimetric immunosensor for detection of aflatoxin M₁ in milk. *Sens Actuators B Chem*. 2012;168:223-30.
130. Masoomi L, Sadeghi O, Banitaba MH, Shahrjerdi A, Davarani SSH. A non-enzymatic nanomagnetic electro-immunosensor for determination of Aflatoxin B₁ as a model antigen. *Sens Actuators B Chem*. 2013;177:1122-7.

131. Micheli L, Grecco R, Badea M, Moscone D, Palleschi G. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M₁ determination in milk using screen-printed electrodes. *Biosens Bioelectron.* 2005;21:588-96.
132. Sapsford KE, Taitt CR, Fertig S, Moore MH, Lassman ME, Maragos CM, Shriver-Lake LC. Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B₁ in corn and nut products using the array biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2006;21:2298-305.
133. Singh C, Srivastava S, Ali MA, Gupta TK, Sumana G, Srivastava A, Mathur RB, Malhotra BD. Carboxylated multiwalled carbon nanotubes based biosensor for aflatoxin detection. *Sens Actuators B Chem.* 2013;185:258-64.
134. Tan Y, Chu X, Shen GL, Yu RQ. A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B₁ determination in rice. *Anal Biochem.* 2009;387:82-6.
135. Parker CO, Tothill IE. Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M₁ in milk with focus on matrix interference. *Biosens Bioelectron.* 2009;24:2452-7.
136. Benzuidenhout SC, Gorst RMMA, Marasas WFO, Spiteller G, Vleggaar R, Gelderblom, WCA. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J Chem Soc Chem Commun.* 1988;11:743-5.
137. Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:2101-5.
138. Marasas WF. Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. *Adv Exp Med Biol.* 1996;392:1-17.
139. Plattner RD, Weisleder D, Shackelford DD, Peterson R, Powell RG. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia.* 1992;117:23-8.
140. Merrill AH Jr, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Perspect.* 2001;109:283-9.
141. Riley RT, Enongene E, Voss KA, Norred WP, Meredith FI, Sharma RP, Spitsbergen J, Williams DE, Carlson DB, Merrill AH Jr. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 2001;109:301-8.
142. Voss KA, Smith GW, Haschek WM. Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim Feed Sci Technol.* 2007;137:299-325.
143. Merrill AH Jr, Wang E, Gilchrist DG, Riley RT. Fumonisin and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. *Adv Lipid Res.* 1993;26:215-34.
144. Merrill AH Jr, Wang E, Vales TR, Smith ER, Schroeder JJ, Menaldino DS, Alexander C, Crane HM, Xia J, Liotta DC, Meredith FI, Riley RT. Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. *Adv Exp Med Biol.* 1996;392:297-306.
145. Riley RT, Voss KA, Norred WP, Sharma RP, Wang E, Merrill AH. Fumonisin: mechanism of mycotoxicity. *Rev Med Vet.* 1998;149:617-26.

146. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AHJr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. J. Biol. Chem. 1991;266:14486-90.
147. Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, Van der Lugt JJ. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort J Vet Res. 1988;55:197-203.
148. Ross PF, Wilson TM, Owens DL, Nelson HA, Richard JL. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. Mycopathologia. 1991;114:129-35.
149. Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. Carcinogenesis. 1991;12:1247-51.
150. Howard PC, Eppley RM, Stack ME, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Kovach RM, Bucci TJ. Fumonisin B₁ carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F(1) mice. Environ Health Perspect. 2001;109:277-82.
151. Ledoux DR, Brown TP, Weibking TS, Rottinghaus GE. Fumonisin toxicity in broiler chicks. J. Vet. Diagn. Invest. 1992;4:330-3.
152. Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WFO, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ, Koch KR. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. J Agric Food Chem. 1990;38:1900-3.
153. Ueno Y, Iijima K, Wang SD, Sugiura Y, Sekijima M, Tanaka T, Chen C, Yu SZ. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvest in Haimen, China, by HPLC and ELISA. Food Chem Toxicol. 1997;35:1143-50.
154. Cifuentes G. Perfil epidemiológico de las anomalías del tubo neural en Guatemala, durante el año 2000 [Tese de Doutorado]. Guatemala City: Universidad San Carlos de Guatemala School of Medicine; 2002.
155. Gelineau-van Waes J, Starr L, Maddox J, Aleman F, Voss KA, Wilberding J, Riley RT. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanisms in an *in vivo* mouse model. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2005;73:487-97.
156. Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill AHJr, Rothman J, Hendricks KA. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. Environ. Health Perspect. 2006;114:237-41.
157. Comissão Europeia. Recomendação da comissão de 17 de Agosto de 2006 sobre a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal. Jornal Oficial da União Europeia; L 229/7-L 229/9; 2006.

158. Comissão Europeia. Regulamento (CE) n. 1126/2007 da Comissão de 28 de Setembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n. 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios, no que se refere às toxinas do *Fusarium* no milho e nos produtos à base de milho. Jornal Oficial da União Europeia; 2007. L255/14-L255/17.
159. Azcona-Olivera JI, Abouzied MM, Plattner RD, Pestka JJ. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂, and B₃. J Agric Food Chem. 1992;40:531-4.
160. Barna-vetró I, Szabó E, Fazekas B, Solti L. Development of a sensitive ELISA for the determination of fumonisin B₁ in cereals. J Agric Food Chem. 2000;48:2821-5.
161. Shiu CM, Wang JJ, Yu FY. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid one-step immunochromatographic strip for fumonisin B₁ in grain-based food and feed samples. J Sci Food Agric. 2010;90:1020-6.
162. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Bird C, Miller BM. Determination of fumonisins in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. J Agric Food Chem. 1996;44:159-64.
163. Yeung JM, Prelusky DB, Savard ME, Dang BDM, Robinson LA. Sensitive immunoassay for fumonisin B₁ in corn. J Agric Food Chem. 1996;44:3582-6.
164. Kim EK, Shon DH, Chung SH, Kim YB. Survey for fumonisin B₁ in Korean corn-based food products. Food Addit Contam. 2002;19:459-64.
165. Quan Y, Zhang Y, Wang S, Lee N, Kennedy IR. A rapid and sensitive chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fumonisin B₁ in food samples. Anal Chim Acta. 2006;580:1-8.
166. Wang S, Quan Y, Lee N, Kennedy IR. Rapid determination of fumonisin B₁ in food samples by enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay. J Agric Food Chem. 2006;54:2491-5.
167. Sheng Y, Jiang W, De Saeger S, Shen J, Zhang S, Wang Z. Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of fumonisin B₁ in maize. Toxicon. 2012;60:1245-50.
168. Paepens C, De Saeger S, Sibanda L, Barna-Vetró I, Léglise I, Van Hove F, Van Peteghem C. A flow-through enzyme immunoassay for the screening of fumonisins in maize. Anal Chim Acta. 2004;523:229-235.
169. Wang YK, Shi YB, Zou Q, Sun JH, Chen ZF, Wang H, Li SQ, Yan YX. Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B₁ in corn, wheat and feedstuff samples. Food control. 2013;31:180-8.
170. Kadir MKA, Tothill IE. Development of an electrochemical immunosensor for fumonisins detection in foods. Toxins. 2010;2:382-98.

171. Mullet W, Lai EPC, Yeung JM. Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Biochem.* 1998;258:161-7.
172. Thompson VS, Maragos CM. Fiber-Optic Immunosensor for the detection of fumonisin B₁. *J Agric Food Chem.* 1996;44:1041-6.

25

CAPÍTULO

DESAFIOS DA EXTRAÇÃO DO RNA DO VÍRUS DA DENGUE (LIGAÇÃO E EXTRAÇÃO AO DNA: MÉTODOS, APLICAÇÕES E LIMITAÇÕES)

Raquel Spinassé Dettogni
Lúri Drumond Louro

25.1 INTRODUÇÃO

Em muitos países, a dengue é uma das doenças infecciosas mais preocupantes e frequentes desde o final do último século¹. Trata-se de uma arbovirose humana importante em termos de morbidade e mortalidade e constitui um problema de saúde pública no mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem a proliferação dos seus vetores, os mosquitos do gênero *Aedes*. Estima-se que acima de 2,5 bilhões de pessoas vivam em área de risco e mais de cem países possuam transmissão endêmica da doença^{2,3}. Essa infecção pode ser assintomática ou

promover quadros clínicos que variam de síndrome gripal leve, conhecida como febre da dengue, a uma doença grave e por vezes fatal denominada febre da dengue hemorrágica/síndrome de choque da dengue.

Os surtos de dengue são causados por quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus da dengue (DENV), denominados vírus da dengue tipo 1 a 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4)⁴. Esses vírus pertencem à família *Flaviviridae*, ao gênero *Flavivirus* e possuem genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 11 quilobases de tamanho e massa molecular de 4×10^6 daltons⁵. O vírion dos flavivírus tem formato esférico e diâmetro de 40 a 60 nanômetros (nm) (Figura 25.1).

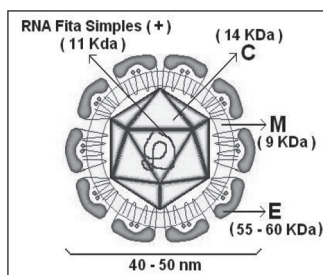


Figura 25.1 Morfologia do vírion de um *Flavivirus*⁶. Legenda: Kda, quilodaltons; C, proteína do capsídeo; M, proteína da membrana; E, proteína do envelope; nm, nanômetros.

A presença do DENV pode ser detectada para fins clínicos e de pesquisa por técnicas sorológicas e moleculares de isolamento viral. Os métodos sorológicos detectam anticorpos contra o DENV e podem ser realizados somente após a fase aguda da doença (após o sexto dia de sintomas aproximadamente). Além disso, não permitem a sorotipagem e a quantificação viral^{7,8}. O isolamento viral permite a detecção e a sorotipagem do DENV já na fase aguda da doença, porém não permite a quantificação viral. O isolamento também apresenta a desvantagem de ter seu sucesso afetado por muitos problemas de manipulação e armazenamento das amostras, além da grande demanda de tempo, trabalho e instalações especiais. As metodologias moleculares, cujo objetivo é a detecção do genoma viral, tornaram-se excelentes ferramentas para diagnóstico e pesquisa do DENV, por serem mais rápidas e sensíveis que as outras metodologias⁷⁻¹⁰. Com o uso de técnicas moleculares, podem ser feitos testes diagnósticos sensíveis e variados estudos específicos

do genótipo viral, importantes em muitas áreas¹¹. Dentre os métodos moleculares para detecção de vírus com genoma de RNA, como o DENV, está a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *reverse transcription-polymerase chain reaction* – RT-PCR). Nessa técnica, a transcrição reversa produz ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir do RNA viral, e a posterior PCR amplifica esse DNA. A RT-PCR apresenta várias modificações com etapas pós-reação em cadeia da polimerase (PCR), como *nested*-PCR, hibridização dos produtos com sondas de oligonucleotídeos tipo-específicas (*Southern blot/Dot blot*), reações de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (do inglês, *restriction fragment length polymorphism* – RFLP), eletroforese de campo pulsado (do inglês, *pulsed field gel electrophoresis* – PEGF), microarranjos de DNA e sequenciamento dos nucleotídeos dos produtos da PCR. Todas essas modalidades permitem rapidamente detectar e sorotipar o DENV na fase aguda da dengue. Uma modificação mais recente da RT-PCR é a RT-PCR em tempo real, que possui mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência, de modo que a amplificação, a detecção e a quantificação do DNA acontecem em uma única etapa. Essa metodologia permite, além de detectar e sorotipar o DENV nos primeiros dias de sintomas, quantificar o vírus, ou seja, medir a carga viral presente na amostra^{9,10}. A RT-PCR em tempo real que disponibiliza resultados de quantificação se chama RT-PCR em tempo real quantitativa (do inglês, *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction* – qRT-PCR)¹²⁻¹⁸.

A primeira etapa necessária para a realização de qualquer metodologia molecular para estudo do DENV é a extração/purificação do RNA viral. A extração do RNA é um passo crítico para a detecção segura do vírus^{19,20} e é o elemento-chave para o sucesso das análises moleculares.

25.2 HISTÓRICO

Na década de 1960, Kurland e colaboradores desenvolveram o isolamento de RNA por centrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl)²¹, e, desde então, novos protocolos para extração de RNA de variadas amostras foram desenvolvidos. Modificações a esse método foram feitas, sendo umas das mais usadas e iniciais a ultracentrifugação em CsCl disponibilizada por Glisin e colaboradores em 1974²². Embora a extração por gradiente de CsCl tenha sido o primeiro método de purificação do RNA, atualmente é pouco usado, principalmente entre as formas comerciais de extração²¹.

Em 1968, Kirky, Later e Chirgwin aperfeiçoaram a extração de RNA usando tiocianato de guanidina, um forte desnaturante, e β -mercaptoetanol (β -met), um agente redutor, em conjunto ou com extração por etanol ou com ultracentrifugação em CsCl^{23} . Posteriormente, Feramisco e colaboradores, em 1982, descreveram o sucesso da combinação da guanidina com fenol para a extração de RNA²⁴. Devido às várias desvantagens e baixa reprodutibilidade das técnicas desenvolvidas até então, foram necessários novos aperfeiçoamentos, e em 1987 Piotr Chomczynski e Nicoletta Sacchi publicaram o método de extração orgânica com tiocianato ácido de guanidina-fenol-clorofórmio, no qual, em uma única etapa, foi possível a extração do RNA dentro de quatro horas²⁵. Devido à sua maior agilidade, maior facilidade, sensibilidade, pureza do RNA, reprodutividade e diminuição da quantidade de amostra necessária, esse método tornou-se padrão ouro na extração de RNA, sendo usado como princípio de muitos reagentes comerciais^{9,21,26,27}.

O conhecimento da capacidade do ácido nucleico de se ligar a partículas magnéticas, de sílica e de vidro na presença de agentes caotrópicos é anterior ainda ao desenvolvimento da primeira técnica de extração de RNA²⁶. Em 1982, Marko e colaboradores usaram essa propriedade para a extração de ácido nucleicos por meio de partículas de vidro na presença de percolato de sódio²⁸. Em 1990, essa técnica foi aperfeiçoada por Boom e colaboradores²⁹ com uso de tiocianato de guanidina como agente caotrópico para ligação do ácido nucleico a partículas de sílica. Posteriormente, foram desenvolvidos vários protocolos de adsorção do RNA a esferas magnéticas. Devido à sua rapidez e facilidade, a técnica de Boom e colaboradores²⁹ foi usada como base para grande parte dos kits comercialmente disponíveis que usam minicolumnas de sílica em tubos de ensaio para adsorção e isolamento do ácido nucleico.

25.3 EXTRAÇÃO DE RNA DO VÍRUS DA DENGUE

O RNA do DENV pode ser detectado em soro, plasma, líquido cerebrospinal e tecidos frescos ou fixados em parafina. Um estudo realizado por Mizuno e colaboradores em 2007³⁰ detectou o DENV-1 em amostras de urina e saliva de um paciente com dengue, mostrando que outros tipos de amostras também podem ser usados. Prado e colaboradores, em 2005³¹, conseguiram detectar o genoma viral em amostras de sangue coletado em papel de filtro, com manutenção da integridade do RNA por até nove semanas após a coleta do sangue. Esse é um método de coleta fácil e vantajoso;

porém, muitos laboratórios ainda não conseguem isolar com sucesso o genoma viral a partir do sangue em papel filtro, e para isso são necessários mais estudos que aprimorem um protocolo reprodutível.

O RNA pode estar presente nessas amostras em baixas titulações, e a qualidade após a extração é crucial para as reações subsequentes⁷. Embora alguns vírus possam ser detectados no plasma, sem qualquer purificação anterior³², esse não é o caso do DENV. Assim, é importante atenção especial à etapa de extração do seu RNA.

25.4 QUALIDADE DA EXTRAÇÃO

Primeiramente, deve-se levar em consideração que o RNA é uma molécula instável e de fácil degradação, pois, além de ser fita simples, a presença do grupo hidroxila no carbono de número 2 na sua ribose (Figura 25.2) facilita a sua reação com enzimas degradativas. Como o pré-requisito para o funcionamento das técnicas moleculares é a extração de um RNA puro, íntegro e de qualidade³³, os métodos de extração de RNA são otimizados para a sua proteção durante todo o processo.

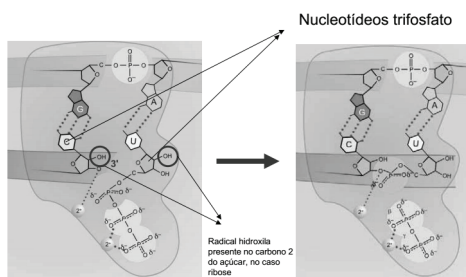


Figura 25.2 Esquema do ataque nucleofílico e formação da ligação fosfodiéster. Nos círculos estão destacadas as hidroxilas livres do carbono de número 2 das riboses.

Antes da extração devem ser observadas as necessidades de cuidado na coleta e armazenamento das amostras. Para amostras de sangue, a extração deve ser procedida rapidamente após a coleta da amostra (entre quatro e seis horas). Caso a extração não possa ser realizada nesse período, o sangue coletado em tubo sem gel separador de plasma deve ser centrifugado e o soro/plasma transferido para outro tubo dentre quatro e seis horas para

que seja congelado a -80°C até a extração do RNA³⁴. O plasma de sangue coletado em tudo com gel separador pode ser mantido refrigerado por até 5 dias, quando então deve ser congelado a -80°C ou submetido à extração do RNA. Tecidos devem ser congelados em nitrogênio líquido, embebidos em solução de preservação de RNA ou submetidos à extração do RNA em até uma hora após a coleta³⁴. Geralmente, amostras de tecidos são coletadas de falecidos, sendo importante limitar o tempo entre o falecimento e a coleta²¹. Amostras de líquido cerebrospinal devem sempre permanecer em banho de gelo e o RNA deve ser extraído em até quatro horas após a coleta³⁴ (Figura 25.3).

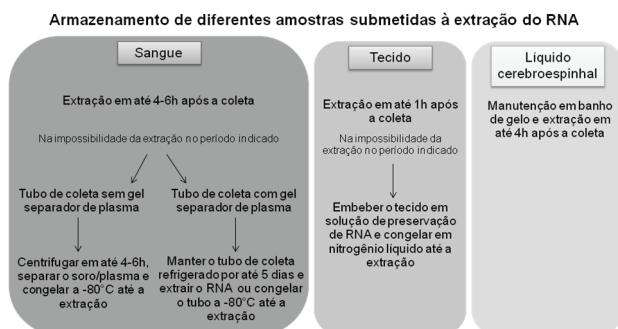


Figura 25.3 Fluxograma mostrando o período ideal para realização da extração do RNA após a coleta das diferentes amostras e o modo de armazenamento destas até a extração.

Resultados moleculares falsos negativos (resultados negativos por erro na detecção do RNA, e não pela ausência do vírus) são frequentemente causados pela ação de ribonucleases (RNases), enzimas que degradam o RNA e impossibilitam a amplificação do DNA na PCR. Essas enzimas são motivo de preocupação, uma vez que, além de possuírem grande capacidade de degradação, são estáveis, não precisam de cofatores, estão presentes em muitos locais (amostra, soluções, manipulador e ambiente) e são resistentes a vários tratamentos, inclusive térmicos, como fervura e autoclavagem^{26,35,36}. Por isso, durante todas as etapas de extração do RNA devem ser tomadas precauções rigorosas contra a contaminação com RNases: luvas devem ser usadas a todo o momento e trocadas frequentemente para evitar a contaminação com RNases presentes nas mãos; todo material de plástico

utilizado deve ser estéril, livre de RNAses e não deve ser reutilizado; é recomendado o uso de ponteiras com filtro; pipetas devem ser de uso exclusivo para extrações de RNA; vidrarias devem ser bem lavadas, tratadas com o inibidor de RNAses chamado dietilpirocarbonato (DEPC), autoclavadas e secas em estufa; utensílios tratados com DEPC devem ser posteriormente submetidos à total remoção do DEPC, pois este pode inibir reações moleculares subsequentes; água e soluções a serem usadas devem ser tratadas com DEPC e autoclavadas (com exceção de soluções contendo tris(hidroximetil)aminometano, pois este inativa o DEPC); se possível, as soluções devem ser filtradas em membrana de nitrocelulose (0,22 μm) para melhor retirada de RNAses; tubos, amostras e soluções devem ser abertos somente quando necessário e, por fim, RNAses endógenas da amostra devem ser inativadas no primeiro passo de qualquer protocolo de extração de RNA²¹. Em adição a esses cuidados, os protocolos podem usar um “sistema repórter”, um RNA sintético marcado com radiação, como, por exemplo, fósforo-32 (³²P). A recuperação desse RNA intacto ao final da extração indica que o protocolo funcionou corretamente, sem degradação por RNAses²¹.

Outra importante consideração a se fazer sobre o RNA é que, uma vez extraído, é recomendado que seja armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, idealmente, em alíquotas, pois além de ser instável devido à degradação por RNAses, o RNA também é facilmente degradado por processos de congelamento seguidos de descongelamento. O congelamento do RNA em alíquotas permite que ele seja submetido apenas uma vez ao descongelamento³⁶.

Para evitar resultados falsos negativos ou até mesmo falsos positivos, é recomendado o uso de controles positivos e negativos desde a extração do RNA³⁶. O controle positivo é uma amostra que se sabe que contém o vírus, de preferência uma amostra diluída para uma concentração viral que esteja no limite de detecção da técnica de extração. Esse controle é importante para a garantia da sensibilidade da técnica. Já o controle negativo é uma amostra na qual se sabe que o vírus está ausente. Essa amostra sempre deve ser manipulada por último, após as amostras serem analisadas e após os controles positivos, de modo a garantir que não houve contaminação entre as amostras durante o processo de extração.

As técnicas de extração de RNA podem ser qualificadas quanto à quantidade e pureza do RNA por meio da espectrofotometria. Nessa análise, um espectrofotômetro como o NanoDrop (Thermo Scientific), por exemplo, mede a absorbância do RNA, o qual o absorve a luz no comprimento de onda de 260 nm. Inicialmente uma alíquota da solução com o RNA extraído é diluída em água deionizada e submetida à leitura da absorbância pelo

espectrofotômetro. A medida da absorbância a 260 nm (A260) possibilita o cálculo da quantidade do RNA extraído por meio da fórmula:

$$\text{(Equação 25.1)} \quad [\text{RNA}] = (\text{A260} \times \text{Fc} \times \text{fd})/1000$$

em que Fc corresponde ao fator de conversão que é de valor 40 (A260 nm = 1 corresponde a 40 microgramas por mililitros ($\mu\text{g/mL}$) de RNA); fd corresponde ao fator de diluição da amostra em água para a leitura do espectrofotômetro e o resultado é dividido por mil para uma concentração em microgramas por microlitro ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Proteínas absorvem a luz no comprimento de onda de 280 nm, e o espectrofotômetro já disponibiliza a razão da A260 pela absorbância a 280 nm (A280) da solução de RNA. Razões A260/A280 maiores ou iguais a 1,75 indicam que a técnica de extração do RNA conseguiu disponibilizar um RNA com pureza satisfatória. Uma razão com valor entre 1,8 e 2,0 é a ideal para qualquer análise de RNA, pois indica um alto grau de pureza da solução de RNA extraído. Já razões abaixo de 1,75 indicam presença de contaminantes como proteínas e DNA ou acidez da solução contendo o RNA, ou seja, indicam que a técnica de extração não disponibilizou um RNA com pureza satisfatória. Metodologias posteriores à extração do RNA mais simples, como a RT-PCR, podem ser realizadas com sucesso, mesmo após uma extração de um RNA impuro, no entanto, técnicas mais elaboradas, como sequenciamento ou medidas de expressão gênica com microarranjos, requerem um RNA puro.

25.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO RNA

As variadas técnicas aplicadas na extração do RNA viral podem ser divididas em três grandes grupos: (1) técnicas baseadas no uso de fortes agentes desnaturantes e componentes orgânicos, como as técnicas derivadas da técnica de Chomczynski-Sacchi (1987)²⁵; (2) métodos baseados na adsorção do RNA a superfícies específicas na presença de sais caotrópicos, como os kits comercialmente disponíveis baseados na afinidade do RNA a membranas de sílica/gel chamadas colunas ou as técnicas derivadas da metodologia de Boom e colaboradores (1990)²⁹; e (3) protocolos que exploram a separação do RNA em gradiente de centrifugação isopícnico^{21,26}.

As técnicas de extração são variadas, mas usam etapas básicas para a extração do RNA. Inicialmente as membranas lipídicas são lisadas por uma solução detergente. Em seguida, é feita a purificação do RNA: remoção de

restos celulares; desnaturação proteica; remoção de contaminantes como proteínas, DNA e fenol e separação do RNA dos outros componentes. Depois de purificado, o RNA é precipitado ou isolado, e a última etapa é a dissolução ou eluição do RNA com água ou tampão. A eluição pode ser antecedida pela reidratação do RNA quando necessário.

25.6 EXTRAÇÃO ORGÂNICA

Nos protocolos de extração orgânica do RNA a amostra é lisada por agentes químicos desnaturantes como tiocianato de guanidina e redutores como o β -met^{37,38} e, posteriormente, a solução é submetida à extração orgânica com fenol e clorofórmio e à precipitação com álcool. A centrifugação da solução (amostra, fenol, clorofórmio e agente desnaturante) resulta na formação de três fases com cor, conteúdo e localização diferentes no tubo: uma fase aquosa superior de cor clara, que contém os ácidos nucleicos; uma pequena camada esbranquiçada intermediária, que contém proteínas dissolvidas em fenol e uma fase orgânica inferior de coloração rósea, que contém lipídeos dissolvidos em clorofórmio e fenol (Figura 25.4). Por precipitação com álcool, o RNA é recuperado da fase aquosa.

O tiocionato de guanidina e o β -met desnaturam proteínas por quebra de ligações não covalentes que mantêm a estrutura terciária e quaternária das proteínas, fazendo-as precipitar, perder a estabilidade e consequentemente perder a atividade biológica. O primeiro reagente é um agente caotrópico³⁹, que quebra ligações hidrofóbicas, e o segundo é um agente redutor, que



Figura 25.4 Fases formadas na extração orgânica do RNA.

desfaz as ligações dissulfeto⁴⁰. Desse modo, ambos conseguem efetivamente inativar as RNases presentes na amostra.

O fenol utilizado deve ser livre de nucleases e hidratado ou saturado com água. Esse fenol é uma solução de 72% de fenol e 28% de água, com pH ajustado para 4²⁶. Esse pH ácido é importante para manter o RNA na fase aquosa e remover o DNA dessa fase, uma vez que a extração de ácidos nucleicos por fenol é pH-dependente: em pH básico o DNA fica na fase aquosa, e em pH ácido o DNA é desnaturado e precipita para a fase orgânica, ficando somente o RNA na fase aquosa⁴¹.

Clorofórmio é um solvente orgânico que, além de ajudar na desnaturação proteica e facilitar na formação das três fases, também tem o papel fundamental de remover o fenol residual da fase aquosa. O clorofórmio é em torno de 10 vezes mais solúvel em água que o fenol e, portanto, consegue separar o fenol da fase aquosa. O álcool isoamílico pode ser usado juntamente com o clorofórmio para ajudar na separação das fases, uma vez que diminui a formação de espuma²⁶.

O RNA é recuperado da fase aquosa por precipitação com etanol e sal catiônico. Após centrifugações é formado um *pellet* esbranquiçado no fundo do tubo contendo o RNA. Essa coloração branca deve-se à presença de sais precipitados juntamente com o RNA, os quais devem ser removidos por lavagens com etanol²¹. O etanol induz a transições estruturais nas moléculas de RNA, de modo a causar a formação de agregados que precipitam. Assim, ocorre a concentração do RNA e sua separação dos outros componentes da fase aquosa. Os sais catiônicos usados podem ser cloreto de sódio, acetato de sódio e acetato de amônio, sendo os dois últimos preferenciais, pois o cloreto de sódio tem baixa afinidade pelo etanol, sendo mais difícil de ser retirado do *pellet*²⁶. O isopropanol pode ser usado no lugar do etanol na precipitação, sendo importante para casos nos quais a capacidade de volume do tubo usado na extração é limitada, pois a quantidade de isopropanol usada para precipitar certa concentração de RNA é menor que a quantidade de etanol necessária. No entanto, atenção especial deve ser dada ao se usar isopropanol, pois este coprecipita sais com o RNA e é menos volátil que o etanol. Assim, o *pellet* formado por precipitação com isopropanol precisa ser lavado com etanol para a retirada do isopropanol e sais²⁶.

O RNA extraído é dissolvido em água livre de RNases ou tampões apropriados e deve ser armazenado em tubos estéreis, hidrofóbicos, não manipulados por mãos sem luvas e tratados com água tratada com DEPC. O armazenamento deve ser feito em temperaturas de -80 °C ou menores, para garantir a inatividade de RNases e a estabilidade do RNA³⁴.

A extração orgânica é realizada com variadas modificações e representa o “padrão ouro” nas rotinas de laboratório. A técnica de Chomczynski-Sacchi (1987)²⁵, uma das mais conhecidas técnicas de extração orgânica de RNA, foi desenvolvida para extração de RNA a partir de amostras de células cultivadas ou tecidos. Esses autores conseguiram purificar RNA não degradado e com boa quantificação dentro de 4 horas²⁵. Em seu protocolo, Chomzysnki e Sacchi usaram como solução desnaturante (solução D), uma solução feita com 4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sódio em pH 7,0, 0,5% de sarcosil e 0,1 M de β -met. Inicialmente, a solução D é homogeneizada com a amostra e então são adicionados o acetato de sódio, o fenol saturado com água e uma mistura de clorofórmio com álcool isoamílico (na proporção 49:1). A mistura passa por resfriamento e uma centrifugação, após a qual o RNA encontra-se na fase aquosa e os outros componentes nas fases intermediária e orgânica. A porção contendo o RNA é misturada com isopropanol, e a precipitação do RNA é feita a -20°C . O *pellet* de RNA formado após uma centrifugação é misturado com solução D e a precipitação é repetida. Após uma última centrifugação, o *pellet* de RNA é lavado com etanol 70% a 80%, passa pela secagem e é dissolvido em dodesil sulfato de sódio 0,5%²⁵.

Reagentes como TRI Reagente® (Sigma-Aldrich), TRIzol® Reagents (Invitrogen-Life Technologies), Brazol (LCG Biotecnologia), TRIsure (Bio-line), dentre outros, são baseados na técnica de Chomczynski-Sacchi e estão comercialmente disponíveis. O TRI Reagente® e o TRIzol® LS Reagente permitem extração de RNA de origem viral a partir de plasma/soro humanos e oferecem a possibilidade de extração simultânea do DNA e das proteínas presentes na amostra.

A extração orgânica apresenta algumas desvantagens, como a possível separação incompleta das proteínas do RNA e a contaminação da fase aquosa pela fase orgânica. Além disso, as técnicas baseadas nesse tipo de extração podem ser demoradas, são trabalhosas, usam reagentes perigosos, necessitam de muita vidraria e utensílios plásticos e, por fim, podem ser inadequadas para manipulação de muitas amostras^{7,21}. Por outro lado, essa é uma das técnicas que apresenta maior sensibilidade e pureza do RNA. É uma técnica adequada para purificação de RNAs pequenos (menos de 200 nucleotídeos) e que serão usados posteriormente em métodos que requerem muita pureza do RNA.

Os reagentes comercialmente disponíveis baseados nessa técnica reduzem o tempo necessário para a extração do RNA e, por isso, permitem a extração do RNA de muitas amostras facilmente. No entanto, podem não ter a

mesma sensibilidade da extração orgânica realizada com reagentes preparados adequadamente no laboratório²⁶.

25.7 MÉTODOS BASEADOS NA ADSORÇÃO DO RNA

Métodos baseados na adsorção do RNA usam a propriedade desse ácido nucleico de se ligar em superfícies como esferas magnéticas⁴², sílica^{21,43}, materiais de látex de poliestireno⁴⁴, matriz de celulose ou fibras de vidro⁴⁵, na presença de determinados sais ou agentes caotrópicos. Estes possuem a propriedade de desorganizar a estrutura tridimensional de ácidos nucleicos e proteínas, desnaturando essas macromoléculas. Dentre esses métodos, encontra-se a técnica de Boom e colaboradores (1990)²⁹, que usa esferas de sílica, kits que usam partículas de vidro como o *High pure viral nucleic acid kit* (Roche Applied Science), kits que usam esferas magnéticas como o *InviMag® vírus RNA Mini Kit* (STRATEC Molecular) e os kits comercialmente disponíveis que usam minicolunas de sílica.

Boom e colaboradores²⁹ desenvolveram um protocolo para extração de RNA de soro e urina baseado em dois fundamentos: a inativação das RNAses pelo tiocianato de guanidina e a ligação do RNA a partículas de sílica ou diatomáceas (algas unicelulares cuja parede celular é de sílica) na presença de altas concentrações de tiocianato de guanidina. Nesse protocolo, a amostra é lisada por tiocianato de guanidina e é misturada às partículas de sílica para adsorção do RNA. Os complexos de RNA + sílica são sedimentados, e os contaminantes retirados por centrifugação/descarte do sobrenadante. O RNA adsorvido à sílica é lavado com etanol e acetona e posteriormente é deixado para secar. Por fim, o RNA é eluído em um tampão aquoso livre de sal, e a sílica é removida por centrifugação^{7,21,29}. De acordo com os autores do protocolo, essa técnica é barata, não exige muitos equipamentos do laboratório e disponibiliza RNA livre de RNAses, portanto, não degradado⁷. Desvantagens desse método são a dificuldade na remoção das partículas de sílica após a eluição do RNA e a baixa eficiência na extração de pequenos RNAs.

Os kits comercialmente disponíveis baseados em colunas, representadas na Figura 25.5, permitem a extração de RNA em fase sólida a partir de pequenas quantidades de amostra⁴⁶. A amostra é adicionada à coluna e o RNA se liga a ela em pH ácido e alta concentração de sal no tampão de ligação, o qual ainda pode conter agentes desnaturantes, detergentes, isopropanol e indicador de pH. A lavagem das colunas para purificação do RNA

a elas aderido é feita com tampões de lavagem contendo fosfato de potássio ou etanol, e o RNA é eluído com tampão de eluição ou água livre de RNases^{7,21}. As principais etapas da extração de RNA com uso de colunas estão ilustradas na Figura 25.6.



Figura 25.5 Colunas usadas para extração de RNA.

Várias empresas disponibilizam kits baseados em colunas, como a Qia-gen, que apresenta 11 tipos de kits disponíveis para extração de RNA viral, a Invitrogen-Life Technologies (atual Thermo Fisher Scientific – Life Technologies) que possui o *PureLink® RNA/DNA viral purification*, a Axygen, que possui o kit de purificação de DNA/RNA viral, dentre várias outras.

O uso de coluna acelera, facilita, garante o lucro da extração e reduz o risco de contaminação durante o processo. No entanto, assim como a técnica de Boom e colaboradores²⁹, não é adequada para a extração de pequenos RNAs. Alguns pesquisadores descrevem ainda que pode resultar na extração de RNA menos puro se comparado à extração orgânica⁴⁷. A principal desvantagem do uso de kits de colunas é o alto preço. Com o objetivo de solucionar esse problema, Siddappa e colaboradores⁴⁸ publicaram um artigo

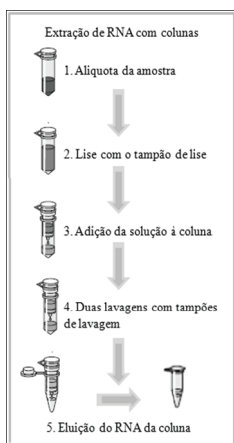


Figura 25.6 Principais etapas da extração de RNA com uso de colunas. (1) Uma pequena quantidade da amostra é adicionada a um microtubo. (2) A amostra é incubada com uma solução de lise para que ocorra a lise das membranas celulares e digestão proteica. (3) A solução resultante é adicionada à coluna e esta é centrifugada. O RNA permanecerá ligado à coluna. (4) Um tampão de lavagem é adicionado à coluna e esta é centrifugada. O processo é repetido e, assim, a coluna é lavada duas vezes para retirada de moléculas, diferentes do RNA, que possam a ela estar aderidas. A lavagem dupla permite que apenas o RNA permaneça ligado à coluna. (5) Um tampão de eluição (ou água livre de RNAses) é adicionado à coluna e esta é centrifugada. Ao final do processo, o RNA é eluído da coluna e encontra-se dissolvido no tampão.

em 2007, no qual descreveram uma técnica para reutilizar as colunas para várias extrações (acima de 20 extrações), sem que elas percam a capacidade de adsorção ou purificação do ácido nucleico⁴⁸. Segundo esses autores, a incubação das colunas usadas em solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M por 24 horas pode eficientemente eliminar qualquer ácido nucleico a elas ligado e deixá-las prontas para uso em uma nova extração. Como os kits fornecem o volume dos reagentes condizente com o número de colunas, os autores relatam que, com a composição correta das soluções necessárias, os laboratórios conseguem fazê-las para reutilizarem as colunas.

25.8 EXTRAÇÃO DE RNA POR GRADIENTE ISOPÍCNICO

A extração de RNA por gradiente isopícnico ou por equilíbrio de gradiente de densidade, como também é chamada, consegue isolar o RNA por ultracentrifugação ou centrifugação em altas velocidades por longo período de tempo, com uso de sais que apresentam gradiente de densidade como

o CsCl ou o trifluoroacetato de cério (CsTFA). Ao longo do processo de extração, o RNA se posiciona no gradiente de densidade desses sais, em uma faixa que corresponde à sua própria densidade²¹ e, assim, pode ser isolado.

É usada uma grande concentração dos sais do metal pesado cério, cujos íons são lentamente levados para o fundo do tubo durante a centrifugação, formando um gradiente contínuo de densidade na coluna líquida presente no tubo. Com o tempo, a tendência de os íons se concentrarem no fundo é contrabalanceada pela tendência de eles se dispersarem por difusão, estabilizando o gradiente. À medida que o gradiente se forma, as moléculas de RNA são levadas para o fundo do tubo ou flutuam até encontrarem uma posição, onde sua densidade de flutuação equivale à sua densidade natural e onde ficam paradas com estabilidade⁴¹.

Para a extração do RNA, inicialmente a amostra é misturada com tiocianato de guanidina e CsCl ou CsTFA e, posteriormente, submetida à centrifugação. A fração de densidade correspondente ao RNA é separada, e o RNA é precipitado com etanol. O uso da guanidina permite, assim como nos outros métodos de extração, inibir a ação das RNases. A sensibilidade e precisão do gradiente de densidade formado permite a separação de moléculas puras de RNA^{21,22}. Essa técnica é tão sensível que pode separar RNAs com pequenas diferenças na composição de bases. As desvantagens desse método são a necessidade de tempo prolongado para centrifugação ou de uma ultracentrífuga.

25.9 SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE EXTRAÇÃO DE RNA

Existem empresas que disponibilizam equipamentos que permitem a extração de ácidos nucleicos de modo totalmente automatizado, ou com uso dos kits comerciais ou com protocolos próprios para os equipamentos. Por meio dessas tecnologias, um maior número de amostras pode ser processado ao mesmo tempo e com menor possibilidade de erro.

Um sistema universal de extração automatizado de RNA da Qiagen chama-se BioRobot. Esse sistema é baseado na ligação do RNA à fase sólida, lavagem desta e eluição do RNA, e permite o processamento de 96 amostras por análise. A Qiagen também possui o sistema robótico QIAcube, que automatiza a extração com os kits baseados em coluna*.

*Ver www.qiagen.com.

A Invitrogen-Life Technologies possui o iPrep™, o qual faz extração automatizada de ácidos nucleicos usando a tecnologia de adsorção a esferas magnéticas. Esse equipamento permite o processamento de 12 amostras em até 30 minutos*.

A Promega possui o sistema Maxuell®, que também usa a tecnologia de esferas magnéticas para extração de até 16 amostras em menos de 45 minutos**.

A Roche Diagnostics possui o equipamento MagnaPure, que realiza até 32 extrações por corrida***.

Além dessas empresas, outras também oferecem sistemas automatizados não só para extração do RNA, mas também para amplificação, quantificação e detecção do RNA, como a Roche Diagnostics, que possui a plataforma Cobas® Ampliprep/Cobas TaqMan.

Embora esses equipamentos tenham custo elevado, manutenção dispendiosa e grande gasto de descartáveis e reagentes próprios, fornecem uma alternativa eficiente para laboratórios com alta demanda de análises.

25.10 COMPARAÇÃO ENTRE AS PRINCIPAIS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE RNA

A técnica ideal de extração seria aquela que disponibilizasse grande quantidade de RNA puro e intacto, de modo rápido e reprodutível, com pouco custo e capaz de permitir extração de grande número de amostras simultaneamente. No entanto, nem todas as técnicas disponíveis apresentam todas essas qualidades juntas. Cada técnica tem vantagens e desvantagens que devem ser revisadas antes de um laboratório decidir qual delas lhe é mais adequada. Abaixo, será feito um resumo dos achados de vários trabalhos que comparam diferentes técnicas de extração de RNA quanto às características de quantidade e pureza do RNA, qualidade da inativação de RNases, custo, rapidez e reprodutividade que cada técnica apresenta. Vale lembrar que dentro da mesma técnica, os variados protocolos também apresentam diferenças.

Poma e colaboradores⁴⁹ compararam três kits comerciais baseados em minicolunas de sílica quanto à quantidade de RNA recuperada, eficiência da posterior amplificação e presença de inibidores de reações moleculares no

* Ver www.lifetechnologies.com.

** Ver www.promega.com.br.

*** Ver www.roche.com.br.

RNA extraído. Os kits comerciais foram *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qia-gen), *PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit* (Invitrogen-Life Technologies) e *NulceoSpin® RNA Virus* (Macherey-Nagel). Segundo os autores, o kit da Invitrogen-Life Technologies apresentou maior eficiência na amplificação do RNA extraído por qRT-PCR, mesmo na presença de inibidores da PCR nas amostras. Isso se deve à maior capacidade desse kit de eliminar contaminantes e, portanto, de purificar o RNA. Substâncias que inibem a PCR e devem ser eliminadas no processo de extração do RNA são: íons de ferro e cálcio, ácido húmico⁵⁰, tanino⁵¹, grupo heme, heparina, anticorpos, lipídeos^{52,53} e tiocianato de guanidina. Essas variações na eficiência da amplificação do RNA entre kits de extração pode ser ocasionada por diferenças na natureza das colunas e dos tampões de lise e lavagem⁴⁹.

Kurar e colaboradores⁵⁴ compararam cinco protocolos para extração de RNA, sendo três baseados na extração orgânica (TRIzol – Invitrogen-Life Technologies, TRIidty – Applichem e EZ-RNA – Omega Bio-Tek) e dois baseados em colunas (UltraClean™ – MO-BIO Laboratories e E.Z.N.A.® – Biological Industries). A comparação foi feita em relação à quantidade e qualidade do RNA e à eficiência da amplificação na RT-PCR. O protocolo que disponibilizou menor quantidade de RNA foi o EZ-RNA, e o que disponibilizou maior quantidade foi o UltraClean™. Os protocolos baseados em colunas precisaram de digestão com enzima que digere DNA (DNase-I), pois apresentaram muita contaminação com DNA. Os cinco protocolos extraíram RNA puro (após digestão com DNase-I), diferindo na quantidade do RNA isolado⁵⁴. Quanto a esse fato, Deng e colaboradores³³ afirmaram que protocolos de extração de RNA orgânica podem ter menor contaminação com DNA quando a coleta da fase aquosa ocorre sem nenhum contato com as outras fases, e o trabalho de Phongsisay e colaboradores⁵⁵ afirma que independentemente do protocolo deve ser usada a digestão com DNase-I para evitar contaminação com DNA e futuros erros na interpretação da RT-PCR. No uso de colunas, o erro do manipulador é bem menos frequente e o processo de extração é simples, mas, como mostrado no trabalho de Kurar e colaboradores⁵⁴, a digestão com DNase-I é indispensável. Esses autores, assim como Bustin⁵⁶, ainda sugerem que o tratamento com DNase-I seja feito apenas na alíquota de RNA a ser usada na análise molecular, e que o RNA a ser armazenado não deve passar pela digestão até ser usado. Isso para evitar que a solução de DNase-I, que pode estar contaminada com RNase, degrade também o RNA. Kurar e colaboradores⁵⁴ também sugerem que o melhor método para conservação do RNA extraído é a produção do

DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa e o armazenamento deste, que é bem mais estável que o RNA.

Em 2011, Dettogni e Louro⁷ compararam a extração do RNA do DENV-2 a partir de plasma humano com uso do *QIAamp® UltraSens Virus Kit* (Qiagen) e do método de Chomzynski e Sacchi (1987)²⁵. No estudo, de 47 amostras de pacientes com diagnóstico clínico da dengue, 34 foram positivas para a presença do DENV-2 pela RT-PCR com o RNA extraído pela extração orgânica e 27 com o RNA extraído pelo kit. Além disso, o estudo mostrou que a extração orgânica isolou RNA com quantificações maiores que o kit⁷.

De Paula e colaboradores¹² compararam três métodos para extração do RNA do DENV: *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*, método de Chomzynski-Sacchi e TRIzol®. De cem amostras analisadas pela RT-PCR, nenhuma foi positiva após extração do RNA por TRIzol® ou pelo método de Chomzynski e Sacchi e seis foram positivas após extração do RNA pelo kit. Assim, segundo os autores, o método mais indicado para extração do RNA para diagnóstico molecular da dengue é o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*.

Um trabalho desenvolvido por Verheyden e colaboradores e publicado em 2003²⁰ comparou três métodos para extração de RNA viral: método de Chomczynski-Sacchi, o kit PURE-SCRIPT® (Gentra Systems), baseado na precipitação diferencial do RNA e o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*. Nesse trabalho, o método menos sensível foi o de Chomczynski-Sacchi e o mais indicado também foi o kit da Qiagen, por sensibilidade e rapidez na extração do RNA.

Fransen e colaboradores, em 1998¹⁹, publicaram um trabalho comparando sete diferentes métodos para extração do RNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os métodos foram: *High Pure Viral* (Boehringer), *RNA kit* (Mannheim), *RNA Insta-Pure LS* (Eurogentec), *PANext RNA Extraction Kit I* (NTL/PAN systems), *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*, técnica de Chomczynski-Sacchi, extração descrita por Boom e colaboradores em 1990²⁹ e extração descrita por Mathy e colaboradores (1996)⁵⁷. O estudo recomendou o kit da Qiagen como o método mais rápido, sensível e de preço acessível para extração do RNA de grande número de amostra.

Verhofstede e colaboradores em 1996²⁷ compararam oito métodos para extração do RNA do HIV: TRIzol®, técnica de Boom e colaboradores²⁹, RNeasy (Qiagen), NASBA (Organon Teknika), Isoquick (Microprobe), técnica de Chomczynski-Sacchi²⁵, RNAID (Bio-101) e Ultraspec (Biotex). Segundo o estudo, a técnica de Chomczynski-Sacchi foi o método que apresentou melhores resultados após análise pela RT-PCR, com maior

sensibilidade e reprodutividade. Os autores lembram, no entanto, que esse método é demorado, pouco vantajoso quando existem muitas amostras a serem analisadas e fácil de passar por erros de contaminação, mistura de amostras e manipulação. Para laboratórios de ampla escala, o estudo recomendou o uso do TRIzol®, que consegue extrair o RNA com bons resultados em apenas duas horas e com menos trabalho.

Fanson e colaboradores (2000)⁴⁷ compararam a extração do RNA de vírus causadores de hepatites por um método orgânico e pelo *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*. Nesse trabalho, o kit comercial apresentou uma sensibilidade aproximadamente dez vezes menor que a extração orgânica, apesar de ser finalizado em um tempo consideravelmente menor. Assim, os autores recomendam que quando a sensibilidade é indispensável para análises futuras, a extração orgânica é a melhor escolha; e caso um processo menos trabalhoso e demorado seja a prioridade, o kit baseado em colunas de sílica é o método mais indicado⁴⁷.

Inúmeros outros trabalhos científicos comparam diferentes técnicas para extração do RNA viral e apresentam conclusões variadas, ora indicando um método, ora indicando outro. Essa situação ocorre porque há muitas variáveis envolvidas no sucesso ou não de alguma técnica. Um exemplo de variável que influencia as conclusões dos trabalhos é a época específica em que os vírus estão presentes nas amostras. Uma técnica de extração somente terá sucesso caso a coleta da amostra seja feita no período adequado. O DENV, por exemplo, permanece na circulação sanguínea até o sexto dia de sintomas da dengue; após esse tempo a quantidade de vírus na circulação é tão pequena que a extração não é mais possível e o método de diagnóstico passa a ser a sorologia, para detecção de anticorpos contra o DENV. Assim, trabalhos que não coletaram as amostras no período certo podem ter cometido erros em suas conclusões. A comparação de métodos que usam quantidades iniciais diferentes de amostra também pode levar a conclusões equivocadas, como relatado por de Paula e colaboradores, uma vez que a quantidade inicial da amostra pode influenciar o resultado das análises moleculares, através da presença relativa de inibidores da PCR¹². Um terceiro exemplo importante de variável é a ocorrência de erros de manipulação durante o processo de extração, os quais podem levar a resultados falsos negativos, como já descrito anteriormente neste capítulo, por degradação do RNA por RNases, por pipetagem errada etc.

De modo geral, com o auxílio dos variados trabalhos mostrando as vantagens e desvantagens de cada método disponível para extração do RNA

viral, cada laboratório deve escolher dentre os métodos e protocolos o que mais atende às suas necessidades.

25.11 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS E/OU INDUSTRIAIS

Qualquer técnica molecular para detecção de vírus com genoma de RNA, como o DENV, é iniciada, como já dito, pela etapa da transcrição reversa, na qual uma enzima chamada transcriptase reversa produz uma molécula de DNA usando o RNA viral como molde. Essa enzima atua como uma DNA polimerase dependente de RNA, ou seja, uma enzima que é capaz de realizar um processo contrário à transcrição comum às células, em que uma RNA polimerase DNA dependente produz uma molécula de RNA a partir de uma molécula de DNA. O isolamento da transcriptase reversa de um retrovírus (vírus com genoma de RNA e que utiliza a transcriptase reversa para a replicação do seu material genético), como o vírus da mieloblastose aviária (*avian myeloblastosis virus* – AMV) ou o vírus da leucemia murina de Moloney (*Monoley murine leukemia virus* – MMLV), permitiu que a transcrição reversa fosse feita *in vitro*, em uma etapa anterior à PCR, a qual, então, amplifica o DNA. Inicialmente, em um tubo de polipropileno mistura-se o RNA extraído, um segmento pequeno de ácido nucleico chamado *primer*, que irá servir como iniciador para a enzima sintetizar o fragmento de interesse, e água ultrapura. A solução é incubada a 75 °C para que o RNA seja aberto, ou seja, desenrolado e, portanto, esteja disponível para servir como molde para a síntese do DNA. Posteriormente adiciona-se ao tubo um tampão adequado para a atividade enzimática, a transcriptase reversa, didesoxinucleotídeos (dNTPs) e água ultrapura se necessário. A solução é então incubada a uma temperatura ideal para a atividade enzimática, para a síntese do DNA e, posteriormente, a uma temperatura elevada, para que a enzima seja inativada e pare a síntese. A molécula de DNA de fita simples produzida *in vitro* pela transcrição reversa chama-se cDNA, o qual, amplificado, pode ser usado nas inúmeras técnicas moleculares.

O diagnóstico das doenças transmitidas por vírus foi revolucionado pelo desenvolvimento das técnicas moleculares de detecção viral, principalmente as variadas formas de uso da PCR. Com sua sensibilidade, agilidade e facilidade na detecção de sequências genômicas virais, as técnicas moleculares têm hoje uma grande aplicação nos ramos clínico e científico. Uma grande mudança da PCR convencional foi a invenção da chamada PCR em tempo real, que, como já dito, melhorou a contribuição da PCR ao diagnóstico

viral, no sentido de ter maior sensibilidade, maior capacidade de amplificação genômica e ainda potencial de quantificar, além de qualificar, a sequência amplificada. Na qRT-PCR em tempo real, as sequências virais são, além de detectadas, quantificadas a cada ciclo de amplificação por contínua determinação de um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de DNA presente após cada ciclo da PCR.

A sensibilidade de muitas técnicas moleculares é grande o suficiente para conseguir detectar o vírus em amostras com até menos de dez cópias virais, caso a amostra seja coletada na época certa, armazenada corretamente e o método de extração seja eficiente^{36,58}. Essa vantagem é importante na detecção dos vírus em formas assintomáticas e em pacientes submetidos a terapias, situações nas quais, possivelmente, a carga viral no paciente está baixa.

Em determinadas análises, uma única reação da PCR, de 25 a 40 ciclos, é capaz de detectar o vírus, porém em várias ocasiões a sensibilidade na detecção precisa ser maior. Nesses casos, são aplicadas outras técnicas moleculares além da PCR convencional, para que ciclos adicionais de amplificação possam aumentar em até cem vezes a sensibilidade da detecção do vírus³⁶.

A PCR e suas variações têm grande importância não só no diagnóstico da dengue, mas também na vigilância epidemiológica e em estudos de eficácia de vacinas testes e de drogas antivirais. Muitos protocolos da PCR são chamados de PCR Multiplex, pois possuem uma combinação de iniciadores para a DNA polimerase que permite detectar a presença dos quatro vírus da dengue de uma só vez, em um só tubo de ensaio. Com a PCR, amostras estocadas por longos períodos podem ter o vírus detectado, e os sorotipos virais circulantes em um determinado momento de local podem ser identificados. Os protocolos da RT-PCR em tempo real permitem, além de todas essas aplicações da PCR convencional, medir a carga viral de uma amostra. Assim, permite a obtenção de informações da dinâmica de uma infecção, da interação do homem com o vírus e da resposta de algum antiviral, o que é importante no prognóstico de um paciente, servindo como um guia do sucesso da terapia^{9,10,59}.

Além dessas técnicas importantes no diagnóstico, um método molecular pós-PCR, denominado sequenciamento nucleotídico, tem importante participação nos estudos virais. O sequenciamento de nucleotídeos dos produtos da PCR permite estudar a variabilidade genética das cepas virais, identificar a rota de origem de uma epidemia e determinar marcadores de virulência, além de fornecer dados para que medicamentos possam acompanhar a alta frequência de mutação viral sem perder sua eficácia. Com as sequências virais estabelecidas por sequenciamento, também podem ser feitos estudos

filogenéticos, que determinam a relação evolutiva entre organismos por meio de seus dados moleculares. Esses estudos podem classificar os quatro sorotipos do DENV em subtipos e genótipos virais, facilitando a caracterização do vírus circulante em uma epidemia¹.

25.12 TÉCNICA PASSO A PASSO

25.12.1 Método de extração por tiocianato ácido de guanidina-fenol-clorofórmio desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987)²⁵, com modificações

Chomczynski e Sacchi²⁵ desenvolveram o protocolo para extração de RNA a partir de células cultivadas ou tecidos e, com modificações, essa técnica pôde ser aperfeiçoada para extração de RNA do DENV a partir de plasma humano. A técnica desenvolvida para a extração do RNA do DENV a partir de plasma humano está descrita a seguir e ilustrada na Figura 25.7.

Soluções usadas no protocolo

- Solução desnaturante ou solução D (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sódio 25 mM, pH 7,0; sarcosil líquido 0,5% e água deionizada). Para o preparo da solução estoque, os reagentes são dissolvidos por 10 minutos a 37 °C. A solução deve ser congelada ou usada em até três meses se mantida em temperatura ambiente.
- β -met 0,1 M. Antes do uso da solução D no protocolo de extração, essa deve ser misturada com o β -met.
- Fenol saturado com água (20 mililitros (mL) de fenol de alto grau de pureza e 20 mL de água destilada). O fenol deve ser descongelado a 60 °C e então adicionado à água e a solução é misturada por vórtex. A solução é centrifugada a 600 \times g por 10 minutos e posteriormente a parte aquosa é removida. O fenol saturado com água pode ser estocado por 30 dias a 4 °C) acetato de sódio 2 M pH 4,0 (acetato de sódio triidratado e água destilada). O acetato deve ser dissolvido na água e o pH ajustado com uso de ácido acético glacial.
- Clorofórmio.
- Álcool isoamílico.
- Isopropanol.

- Solução de glicogênio.
- Etanol 70%.

Procedimentos

- 1) Inicialmente uma alíquota de 900 μL de plasma é dividida igualmente em 3 tubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade (300 μL de plasma em cada tubo).
- 2) A solução D é descongelada a 37 °C e o β -met é adicionado à quantidade de solução D que será usada, na concentração de 0,1 M. Estando a solução preparada, 300 μL de solução D (com o β -met) são adicionados aos tubos com o plasma e a mistura é homogeneizada.
- 3) O próximo passo é o preparo da solução de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 49:1. Aos tubos são então adicionados: 600 μL de fenol saturado com água; 60 μL de acetato de sódio e 120 μL de clorofórmio/álcool isoamílico. A mistura é homogeneizada em vórtex por 10 segundos (s) e incubada a -20 °C por 15 minutos.
- 4) Após esse tempo, os tubos são centrifugados a 13.150 \times g por 15 minutos para a formação das três fases: a fase orgânica inferior, a fase aquosa superior e a fase esbranquiçada intermediária. A fase aquosa (aproximadamente 600 μL) é transferida cuidadosamente para outros três tubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL e a eles é adicionado igual volume de isopropanol, ou seja, se em cada tubo forem adicionados 600 μL de fase aquosa, também serão adicionados 600 μL de isopropanol a cada tubo. Uma quantidade de 2,0 μL de solução de glicogênio pode ser acrescentada para facilitar a visualização do *pellet* de RNA que será formado no próximo passo.
- 5) Para a precipitação do RNA, os tubos são incubados a -20 °C por 16 horas e posteriormente centrifugados a 13.150 \times g por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado e o *pellet* com o RNA estará formado e, se visível, terá aspecto esbranquiçado.
- 6) Para hidratação do RNA é adicionado 1,0 mL de etanol 70% aos tubos, os quais são centrifugados a 13.150 \times g por 2 minutos. Esse etanol é então cuidadosamente descartado por completo, e os tubos são virados com a abertura para baixo para secarem completamente à temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos).
- 7) Estando os tubos secos, o RNA pode ser dissolvido: o *pellet* de um dos tubos é dissolvido em 30 μL de água livre de RNases e posteriormente o *pellet* dos outros dois tubos são dissolvidos com essa mesma água para

concentrar o RNA dos três tubos em um só. Esse RNA extraído deve ser usado imediatamente nas análises moleculares ou armazenado a -80°C para não ser degradado. Caso as análises moleculares não possam ser realizadas todas ao mesmo dia, uma opção é sintetizar o cDNA a partir do RNA extraído por transcrição reversa e então armazenar esse cDNA, que por ser estável, pode ficar a 4°C sem ser degradado.

Extração Orgânica do RNA do Vírus da Dengue

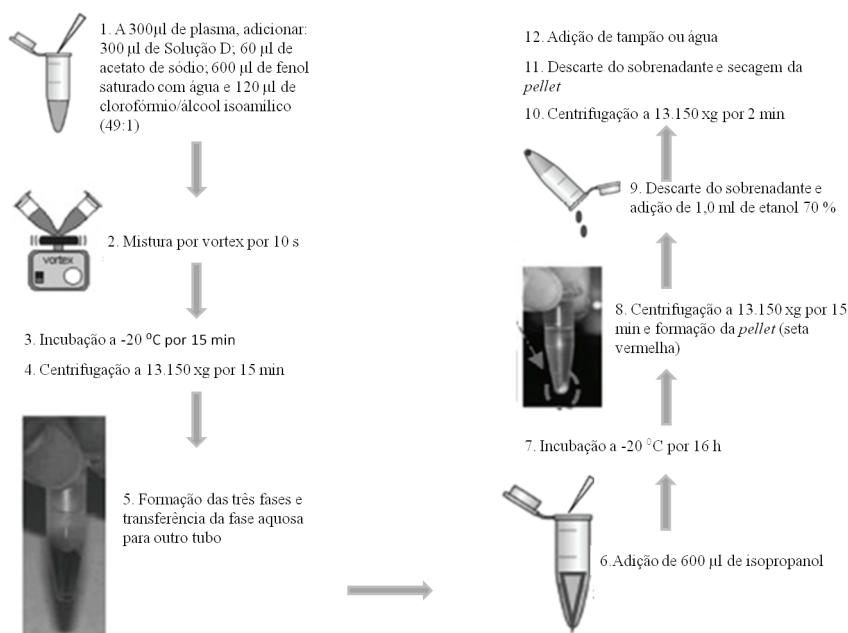


Figura 25.7 Etapas da extração orgânica do RNA do vírus da dengue.

25.13 CONCLUSÕES

Devido à falta de uma vacina eficaz e às dificuldades na erradicação do mosquito vetor, as opções para prevenção e controle das epidemias de dengue são limitadas. Assim, o rápido e eficiente diagnóstico molecular da dengue e a epidemiologia molecular viral são indispensáveis. Um diagnóstico precoce é importante para o início adequado do tratamento e acompanhamento dos pacientes. Estudos da genética viral são imprescindíveis para o

desenvolvimento de vacinas e terapias, e para o conhecimento geral do vírus. Os estudos de vigilância epidemiológica e monitoramento viral são fundamentais para o conhecimento das epidemias, da circulação dos sorotipos e subtipos e, conseqüentemente, para a implementação de medidas de controle da infecção. Todas essas análises moleculares iniciam-se pela etapa crucial comentada neste capítulo, a extração do material genético viral. Assim, pode-se ver a importância do estudo detalhado dos métodos aplicados na extração do RNA, da comparação entre eles, do modo como solucionar os problemas envolvidos no processo de extração, das necessidades especiais envolvidas na manipulação de RNA e, por fim, da disponibilização de dados suficientes para que laboratórios clínicos e de pesquisa possam escolher o método mais adequado em suas extrações.

25.14 PERSPECTIVAS FUTURAS

O rápido crescimento do número de publicações sobre análises moleculares tanto qualitativas como quantitativas demonstra o aumento da importância dessas análises nas áreas científica e clínica. Uma vez que a biologia molecular evoluiu e contribuiu de maneira importante para a pesquisa viral e para o diagnóstico das viroses, há um aumento da consciência sobre a necessidade da garantia da qualidade das análises moleculares. A natureza da PCR apresenta várias limitações difíceis de controlar, particularmente em virologia, campo em que a heterogeneidade do genoma viral, além da variedade de amostras, pode levar a desempenhos inadequados das análises. Assim, é clara a necessidade não só na garantia da qualidade, mas também do estabelecimento de processos moleculares totalmente automatizados, para reduzir o tempo de análise e, principalmente, os erros por variação de manipulador ou laboratório. Essas necessidades deverão levar a um aumento de estudos para melhorar a compreensão do que envolve as tecnologias moleculares e explorar ainda mais essas ferramentas a favor do controle das infecções virais.

REFERÊNCIAS

1. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002;2(1):33-42.
2. WHO. State of the art of new vaccines: research and development initiative for vaccine research. World Health Organization. 2003:1-74.
3. Satish NVT, Abraham P, Sridharan G. Dengue fever: it's laboratory diagnosis with special emphasis on IgM detection. *WHO Dengue Bull*. 2003;27:106-25.
4. Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Foundation Symposium*. 2006;277:177-87. Discussion 87-92, 251-3.
5. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, et al. *Flaviviridae*. *Intervirology*. 1985;24(4):183-92.
6. WC B. Mapeamento das arboviroses no estado de Rondônia. Manaus: Universidade Federal do Amazonas (UFAM); 2007.
7. Dettogni RS, Louro ID. Dengue virus RNA purification from human plasma: a comparison of two techniques. *Molecular Biology Reports*. 2011;38(8):4979-83.
8. Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *Journal of Biosciences*. 2008;33(4):617-28.
9. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(2-3):254-98.
10. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(11):5189-98.
11. Zhong JF, Weiner LP, Burke K, Taylor CR. Viral RNA extraction for in-the-field analysis. *Journal of Virological Methods*. 2007;144(1-2):98-102.
12. De Paula SO, Nunes C, Matos R, de Oliveira ZM, Lima DM, da Fonseca BA. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 2001;98(2):119-25.
13. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(9):2634-9.
14. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(3):545-51.
15. Deubel V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: Gubler DJ KG, editor. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London: CAB International; 1997. p. 335-66.

16. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(1):2-9.
17. Vorndam V, Kuno G, Rosado N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *Journal of Virological Methods*. 1994;48(2-3):237-44.
18. Wang WK, Lee CN, Kao CL, Lin YL, King CC. Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of dengue virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(9):3306-10.
19. Fransen K, Mortier D, Heyndrickx L, Verhofstede C, Janssens W, van der Groen G. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of seven different methods for extraction (part two). *Journal of Virological Methods*. 1998;76(1-2):153-7.
20. Verheyden B, Thielemans A, Rombaut B, Kronenberger P. RNA extraction for quantitative enterovirus RT-PCR: comparison of three methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003;33(4):819-23.
21. Vomelova I, Vanickova Z, Sedo A. Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica*. 2009;55(6):243-51.
22. Glisin V, Crkvenjakov R, Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*. 1974;13(12):2633-7.
23. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;18(24):5294-9.
24. Feramisco JR, Smart JE, Burrridge K, Helfman DM, Thomas GP. Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(18):11024-31.
25. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
26. Dettogni RS, Louro ID. Dengue Virus RNA Extraction Challenges. In: Zhou C LX, editor. *DNA Binding and DNA Extraction: Methods, Applications and Limitations*. New York: Nova Science Publishers; 2011. p. 155-64.
27. Verhofstede C, Fransen K, Marissens D, Verhelst R, van der Groen G, Lauwers S, et al. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *Journal of Virological Methods*. 1996;60(2):155-9.
28. Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Analytical Biochemistry*. 1982;121(2):382-7.
29. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(3):495-503.

30. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(7):738-9.
31. Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodriguez R, Vazquez S, et al. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *Journal of Virological Methods*. 2005;125(1):75-81.
32. Ravaggi A, Primi D, Cariani E. Direct PCR amplification of HCV RNA from human serum. *PCR Methods and Applications*. 1992;1(4):291-2.
33. Deng MY, Wang H, Ward GB, Beckham TR, McKenna TS. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2005;17(6):574-8.
34. Melo MR, Martins AR, Barbosa IV, Romano P, Shcolnik W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010;46(5):375-81.
35. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*. 1997;276(5318):1558-60.
36. Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. *Current Issues in Molecular Biology*. 2007;9(2):87-102.
37. Gordon JA. Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins. *Biochemistry*. 1972;11(10):1862-70.
38. Nozaki Y, Tanford C. The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *The Journal of Biological Chemistry*. 1970;245(7):1648-52.
39. Mason PW, McAda PC, Mason TL, Fournier MJ. Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology*. 1987;161(1):262-7.
40. Nelson DL, Cox M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed; 2011.
41. Karp G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. São Paulo: Manole; 2005.
42. Ovcharenko D, Jarvis R, Hunicke-Smith S, Kelnar K, Brown D. High-throughput RNAi screening in vitro: from cell lines to primary cells. *RNA*. 2005;11(6):985-93.
43. Huang C, Zhang X, Lin Q, Xu X, Hu Z, Hew CL. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*. 2002;1(3):223-31.

44. Iwami M, Tanaka A, Hano N, Sakurai S. Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ hybridization. *Experientia*. 1996;52(9):882-7.
45. Fenton RA, Chou CL, Stewart GS, Smith CP, Knepper MA. Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(19):7469-74.
46. Tolosa JM, Schjenken JE, Civiti TD, Clifton VL, Smith R. Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and proteins from the same sample. *BioTechniques*. 2007;43(6):799-804.
47. Fanson BG, Osmack P, Di Bisceglie AM. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *Journal of Virological Methods*. 2000;89(1-2):23-7.
48. Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M, Ranga U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques*. 2007;42(2):186, 8-92.
49. Poma HR, Davies C, Gutierrez Cacciabue D, Mora MC, Basombrio MA, Rajal VB. Comparison of nucleic acid extraction efficiency using different commercial kits and qPCR. Effect of inhibitors. *Revista Argentina de microbiologia*. 2012;44(3):144-9.
50. Schriewer A, Wehlmann A, Wuertz S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *Journal of Microbiological Methods*. 2011;85(1):16-21.
51. Kontanis EJ, Reed FA. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *Journal of Forensic Sciences*. 2006;51(4):795-804.
52. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(2-3):95-125.
53. Nolan T, Hands RE, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Analytical Biochemistry*. 2006;351(2):308-10.
54. Kurar E, Atlı MO, Guzeloglu A, Ozsensoy Y, Semacan A. Comparison of Five different RNA isolation methods from equine endometrium for gene transcription analysis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2010;16(5):851-5.
55. Phongsisay V, Perera VN, Fry BN. Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;68(2):427-9.
56. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002;29(1):23-39.

57. Mathy NL, Lee RP, Walker J. Removal of RT-PCR inhibitors from RNA extracts of tissues. *BioTechniques*. 1996;21(5):770, 2, 4.
58. Prada-Arismendy J, Castellanos JE. Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Médica*. 2011;42(2):243-8.
59. Yeh HY, Yates MV, Chen W, Mulchandani A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2009;20(1):49-54.

26

CAPÍTULO

NANOTECNOLOGIA VERDE PARA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Luciano Paulino Silva
Cínthia Caetano Bonatto
Flávio Duque Estrada Soares Pereira
Luciane Dias Silva
Vanessa Lima Albernaz
Vera Lúcia Perussi Polez

26.1 INTRODUÇÃO

A nanobiotecnologia é uma área do conhecimento que integra várias ciências, como a física, a química, a biologia e a ciência dos materiais. As nanopartículas, devido ao seu tamanho em nanoescala (em geral de 1 nm a 100 nm), apresentam propriedades novas ou melhoradas baseadas nas suas características específicas (tamanho, distribuição, morfologia, fase, composição, entre outras) quando comparadas a partículas de maiores dimensões provenientes da mesma fonte na qual as nanopartículas foram formadas.

Nanopartículas metálicas (NPMs) são sistemas nanoestruturados que apresentam características físico-químico-biológicas dependentes da sua composição, tamanho e forma. Dentre as aplicações de NPMs, podem ser

destacadas a entrega e liberação de drogas (fármacos, hormônios), insumos agropecuários (fertilizantes, vacinas, pesticidas) e cosméticos (essências e cremes); desenvolvimento de superfícies funcionais (embalagens ativas para proteção de alimentos); elaboração de sensores para diagnóstico de doenças, infecções e contaminações (detecção rápida e sensível); desenvolvimento de sistemas de transferência de genes (eficiência aumentada); produção de pontos quânticos (fontes alternativas para imagem por fluorescência); produção de nanopartículas superparamagnéticas (utilizadas, por exemplo, para a biosseparação seletiva e magnetodiálise); controle de pragas/patógenos (efeitos tóxicos); desenvolvimento de catalisadores (eficácia aumentada); desenvolvimento de sistemas de biorremediação (utilizados para remoção de metais pesados); e aplicações na indústria têxtil (na produção de tecidos com propriedades distintas, incluindo a ação antibacteriana)¹⁻⁷.

Utilizam-se duas abordagens para a síntese de nanoestruturados, incluindo NPMs, conhecidas em nanociência e nanotecnologia como “*top-down*” (de cima para baixo) e “*bottom-up*” (de baixo para cima). A estratégia *top-down* consiste na desconstrução de material macroestruturado, geralmente por técnicas de nanolitografia ou por moagem de alta energia, até a obtenção do produto final nanoestruturado. Essa abordagem é comumente utilizada para produção em escala, mas são observadas dificuldades em obter-se uma homogeneidade nas características do produto final. A outra abordagem, *bottom-up*, segue o caminho oposto, no qual ocorrem interações entre átomos e/ou moléculas individuais para a formação das nanoestruturas. Essa abordagem permite controlar diversos parâmetros, como a distribuição de tamanho e forma das nanopartículas, sendo a mais utilizada na produção de NPMs (Figura 26.1A).

Diversas rotas químicas são utilizadas para a síntese de NPMs a partir de sais metálicos. No entanto, a maioria desses métodos inclui a utilização de solventes tóxicos, a geração de resíduos nocivos para a saúde e o meio ambiente, além de resultar em um consumo de energia alto em rotas geralmente complexas e com múltiplos passos. Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de procedimentos visando à obtenção desses nanossistemas com ampla aplicabilidade tecnológica. Uma abordagem promissora para alcançar esse objetivo é explorar a vasta gama de recursos biológicos disponíveis na natureza por meio da chamada síntese verde⁸⁻¹⁰ (Figura 26.1B).

Síntese verde é a designação comum dada às rotas de síntese que utilizam produtos químicos relativamente atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanomateriais, tendo como fonte primária ou iniciador da rota um organismo biológico ou partes dele (órgãos, tecidos, células,

biomoléculas ou metabólitos)¹¹⁻¹³. Dentre os recursos biológicos disponíveis, os produtos vegetais e animais, algas, fungos, bactérias e a ampla gama de subprodutos derivados de processos agropecuários envolvendo alguns desses organismos possuem potencial para utilização durante a síntese verde de NPMs, por meio de processos de oxirredução em meio aquoso¹⁴.

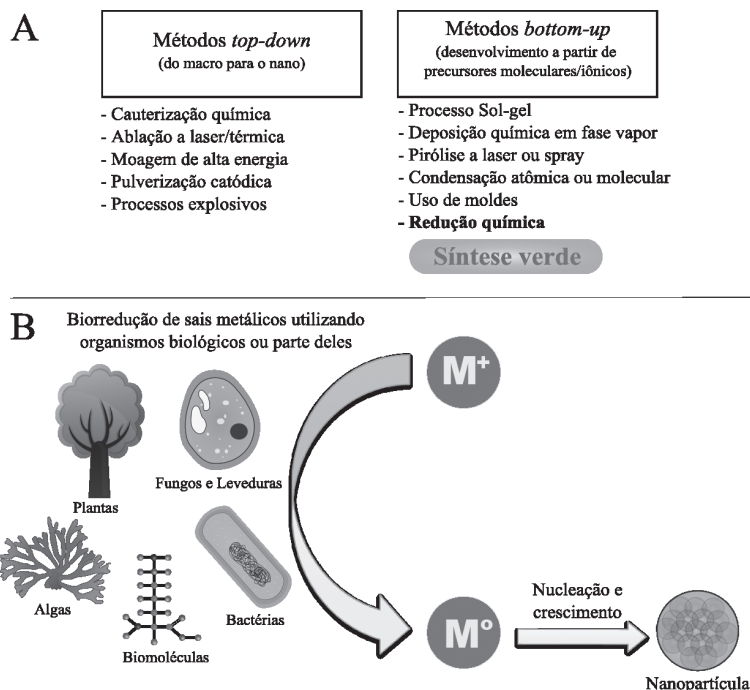


Figura 26.1 Características das principais estratégias utilizadas para produzir nanoestruturas pelas abordagens top-down e bottom-up (A), com destaque para a metodologia de síntese verde de nanopartículas metálicas via redução química de sais metálicos utilizando organismos biológicos como agentes redutores (B).

O aproveitamento da biodiversidade constitui uma etapa importante no conceito de bioeconomia (economia sustentável), no que diz respeito à sustentabilidade das atividades humanas. A nanotecnologia verde é uma abordagem em consonância com a preocupação crescente com questões relacionadas à sustentabilidade utilizando métodos e materiais que visam à geração de produtos com impacto ambiental reduzido associado a ganhos econômicos e sociais^{9,15}. Esse conceito oferece oportunidades quanto à utilização de biomoléculas ou metabólitos em rotas de síntese verde de NPMs devido ao

fato de que esses materiais, quando nanoestruturados, apresentam características novas que possibilitam uma vasta gama de aplicações inovadoras, além de conferir, em geral, características almejavéis de biodegradabilidade e a biocompatibilidade.

A síntese verde de NPMs pode ser realizada utilizando organismos procariontes ou eucariontes (incluindo plantas, animais e micro-organismos), ou parte deles, e pode ocorrer no meio intra ou extracelular¹⁶ (Figura 26.2). Nesse caso, os componentes presentes (biomoléculas e metabólitos secundários) atuam como agentes redutores que promovem a redução do composto-alvo, resultando na formação de NPMs¹⁶. Em alguns casos, e de maneira extremamente apropriada quando se almeja a obtenção de uma suspensão coloidal, esses compostos podem também formar uma camada estabilizante (cobertura) na superfície das NPMs, evitando que estas se agreguem ou cresçam desordenadamente durante sua produção. Além disso, a exposição a diferentes fatores (temperatura, pH e concentração de substrato ou agente redutor) pode alterar a produção de NPMs no meio intra ou extracelular¹⁷⁻²⁰. A maioria das NPMs obtidas por meio de rotas de síntese verde apresenta como características almejavéis sob o ponto de vista de sustentabilidade

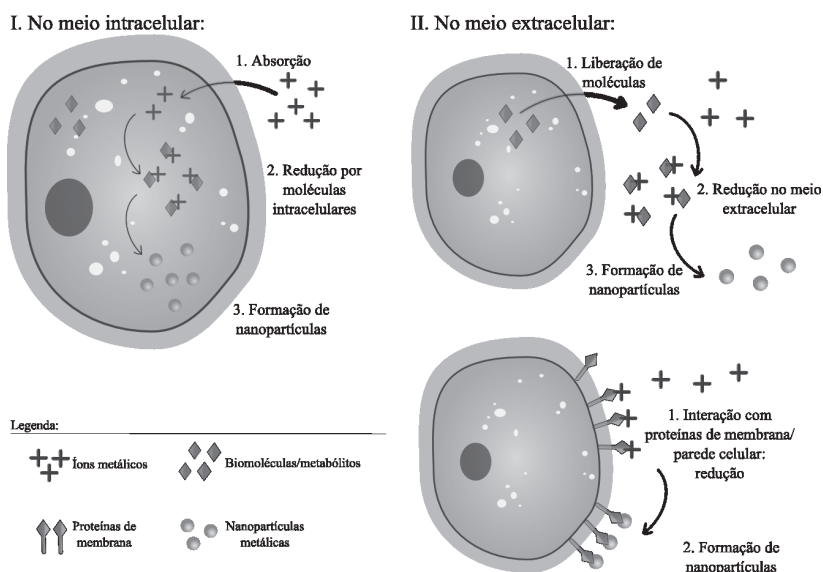


Figura 26.2 Possíveis mecanismos de síntese de nanopartículas metálicas mediada por células. No meio intracelular ocorre absorção dos íons metálicos, que reagem com moléculas intracelulares, onde esses íons são reduzidos e formam nanopartículas. No meio extracelular, a síntese pode ocorrer via interação dos íons metálicos com moléculas liberadas pela célula ou com proteínas de membrana/parede celular.

o fato de serem ecoamigáveis (utilizam solventes menos tóxicos), biocompatíveis (podem ser empregadas diretamente a organismos-alvo), simples (número de etapas menor), biodegradáveis (podem ser degradadas por rotas biológicas) e apresentam custo de produção baixo e rendimento alto^{11,12}.

Organismos de todos os reinos da vida podem apresentar potencial para utilização em rotas de síntese verde de NPMs. Interessantemente, muitos desses organismos que podem ser utilizados em rotas de síntese verde, além de fazer parte da biodiversidade, são cultivados ou criados. Adicionalmente, componentes provenientes de subprodutos agroindustriais, originalmente sem valor econômico, podem ser utilizados em rotas de síntese verde. De fato, o aproveitamento de subprodutos das cadeias produtivas animal, vegetal e microbiana constitui uma etapa importante a ser avaliada durante a gestão do agronegócio, já que eles podem ser úteis e de importância econômica, ou seu acúmulo pode causar impactos ambientais severos. A agregação de valor a materiais considerados menos valiosos sob o ponto de vista econômico ou nutricional constitui uma alternativa eficaz no que diz respeito à sustentabilidade da agroindústria. Bioenergia, indústria alimentícia e nanobiotecnologia são apenas alguns exemplos de setores que se beneficiam de subprodutos agropecuários, esta última em particular da biomassa obtida a partir deles e utilizada em rotas de síntese verde.

Dentre os subprodutos agropecuários que podem servir como matérias primas para o desenvolvimento de processos nanobiotecnológicos, em particular rotas de síntese verde de NPMs, destacam-se: o sangue, as penas, as carapaças, as escamas, os pelos, os ossos e as cascas de ovos provenientes da pecuária; e os bagaços, as fibras, as serragens, os farelos, as cascas e as palhas provenientes da agricultura. O interesse nesses materiais se deve à riqueza de moléculas como as proteínas, os peptídeos, os aminoácidos, os carboidratos, os ácidos nucleicos e as vitaminas. Além de fontes de moléculas que podem ser utilizadas na síntese de NPMs, os subprodutos agropecuários podem ser fontes de princípios ativos com atividades antibióticas, biocidas, antioxidantes, anticâncer, dentre outras, que podem atuar sinergicamente com as NPMs.

Outra fonte inesgotável de matéria-prima para rotas de síntese verde são os diversos produtos agropecuários primários (bactérias, leveduras, grãos, leite e outros). Estes apresentam a produção de uma ampla gama de moléculas, algumas das quais capazes de promover processos de oxirredução, como é o caso de diversas enzimas (como as redutases) e metabólitos (como o peróxido de hidrogênio). De fato, quando expostos a essas moléculas, diversos metais, a partir de seus cloretos, nitratos, sulfatos, entre outras

formas, podem ser convertidos em NPMs empregadas em aplicações biotecnológicas que vão desde o controle de pragas e patógenos até o desenvolvimento de nanocatalisadores e sistemas de biorremediação para o tratamento de efluentes; além de diversas aplicações biomédicas voltadas para o tratamento e diagnóstico de doenças.

26.2 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR BIOMOLÉCULAS

Tipicamente, a síntese verde de NPMs envolve a redução química de um sal metálico na presença de um reagente redutor, o qual pode também, atuar como agente estabilizante na síntese, revestindo as NPMs. Uma vasta gama de biomoléculas atuam como agentes redutores em rotas de síntese verde, dentre as quais os polissacarídeos, as proteínas, os peptídeos, os aminoácidos, os ácidos nucleicos e as vitaminas.

26.2.1 Polissacarídeos

Polissacarídeos são polímeros de carboidratos formados por longas cadeias de unidades de monossacarídeos unidos entre si por ligações glicosídicas. Uma vasta gama de grupos funcionais podem estar presentes nessas biomoléculas, incluindo grupos hidroxila e extremidade hemiacetal, os quais são capazes de reduzir sais precursores de NPMs, como já demonstrado para o ouro²¹. A extremidade redutora de polissacarídeos também pode ser utilizada para introduzir um grupo funcional amina capaz de estabilizar NPMs²². Foi demonstrado que carboidratos com grupos aminados se ligam fortemente à superfície de nanopartículas de ouro e prata (NPOs e NPPs, respectivamente), conferindo-lhe uma superfície hidrofílica²³. Dentre os polissacarídeos utilizados na síntese verde de NPMs podem ser citados o ácido hialurônico, a heparina e a quitosana.

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de massa molecular alta e amplamente distribuído em tecidos conjuntivos de animais, sendo constituído por unidades de ácido glucurônico e N-acetil glicosamina²⁴. O AH é utilizado em diversas aplicações terapêuticas devido à alta compatibilidade biológica²⁵. Nesse sentido, é crescente o interesse em utilizá-lo para o desenvolvimento e síntese de sistemas nanoparticulados, dentre eles na síntese de NPMs. O AH foi utilizado como agente redutor e estabilizante

na formação de NPOs (nanopartículas de ouro/ácido hialurônico – Au-AH) e NPPs (nanopartícula de prata/ácido hialurônico – Ag-AH), as quais apresentaram tamanhos que variaram de 5 nm a 30 nm²⁶. Ag-AH exibiu potente atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e atividade moderada contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, apresentando potencial aplicação na terapêutica antibacteriana²⁷.

Heparina é um polissacarídeo sulfatado pertencente à família das glicosaminoglicanas. Devido ao seu caráter aniônico, é possível utilizar esta molécula como agente redutor e estabilizante na síntese de NPPs. A abundância de grupos sulfonados presentes na molécula promove a redução de íons Ag⁺, possibilitando a formação de NPMs²⁸. Além disso, foi demonstrado que a heparina pode atuar no controle da nucleação e estabilização, modulando o tamanho e a forma de NPPs²⁸.

A quitosana é um polissacarídeo biodegradável de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, obtido pela desacetilação alcalina da quitina, componente importante do exoesqueleto de invertebrados como caranguejos, lagostas, camarões e insetos, e constituindo, portanto, um subproduto importante obtido a partir desses organismos²⁹. Por ser considerado um biomaterial atóxico, biodegradável e biocompatível, a quitosana é utilizada em diversos sistemas nanoestruturados³⁰. Recentemente, essa molécula foi utilizada como agente redutor e estabilizante na síntese verde de NPPs com atividade antimicrobiana. A formação dessas NPPs ocorre por meio da oxidação dos grupos hidroxila da molécula de quitosana na presença de íons de prata³¹.

26.2.2 Proteínas, peptídeos e aminoácidos

A compreensão dos mecanismos bioquímicos por meio dos quais as proteínas propiciam a formação de NPMs tem sido demonstrada com sucesso. Proteínas são utilizadas na síntese de NPMs devido à sua capacidade de interagir com íons inorgânicos, e essas interações são determinantes no tamanho das partículas. A formação de NPOs foi investigada utilizando albumina humana e bovina, as quais apresentaram diâmetros médios de 3,4 nm e 3,5 nm, respectivamente³². No mesmo estudo, verificou-se que o tempo de síntese aumenta à medida que a temperatura de fusão da proteína aumenta, indicando a influência da temperatura no período de nucleação e crescimento das NPOs.

Estudos recentes demonstram o uso de pequenos peptídeos como agentes redutores na formação de NPMs, desempenhando um papel-chave no

processo de nucleação e crescimento de NPOs³³. Além disso, tem sido adotada uma abordagem de inspiração biológica para produzir NPMs utilizando proteínas e peptídeos que ocorrem na natureza como modelos para seleção de peptídeos; ou essas moléculas são racionalmente desenhadas para controlar a formação de nanopartículas³⁴. Nesse sentido, vários peptídeos multifuncionais foram desenvolvidos para sintetizar NPOs com diferentes morfologias e com tamanhos controlados em função da colocação estratégica de resíduos de aminoácidos selecionados na sequência peptídica³³.

Estudos indicam que as unidades constituintes de macromoléculas podem representar uma base para nanofabricação biológica genuína^{35,36}. Logo, aminoácidos podem exercer influência sobre interações específicas entre as biomoléculas e os metais. Sendo assim, pequenas moléculas de D- ou L-aminoácidos podem controlar o tamanho e a forma das estruturas durante a formação de NPMs³⁵.

Aminoácidos, constituintes primários das proteínas, apresentam grupos laterais reativos. Quando em meio aquoso, tornam-se íons dipolares, agindo como ácidos (doadores de prótons) ou bases (receptores de prótons). Assim, os aminoácidos são capazes de reduzir íons de ouro, prata, ferro e outros. Os grupos amina e carboxila dos aminoácidos na superfície das NPMs estabilizam-nas em suspensão, além de ancorá-las virtualmente a qualquer superfície biológica por meio de interações polivalentes.

L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) foi utilizada como agente redutor na síntese de NPOs com potencial aplicação biomédica³⁷. Wang e colaboradores³⁸ demonstraram a formação de nanopartículas magnéticas, com diâmetro de 4 nm a 80 nm, obtidas a partir da redução de íons de ferro pelo aminoácido arginina. As propriedades das NPMs, quando combinadas com as suas toxicidades, poderiam ser utilizadas para produzir nanossistemas com as mais diversas aplicações, como, por exemplo, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antitumorais e carreadores de fármacos³⁹.

26.2.3 Ácidos nucleicos

A síntese de NPMs utilizando ácidos nucleicos ou nucleotídeos é considerada um campo recente⁴⁰. Foi demonstrado que essas biomoléculas e suas unidades fundamentais são capazes de modular o tamanho e propriedades físico-químicas das NPMs⁴¹. Os ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA) consistem em cadeias de unidades monoméricas, denominadas nucleotídeos, ligados entre si por ligações fosfodiéster. A síntese de

nanopartículas também pode ser realizada utilizando os blocos de construção dos ácidos nucleicos, ou seja, por nucleotídeos e nucleosídeos.

Os efeitos de diferentes moléculas de DNA com o mesmo comprimento de cadeia foram investigados durante a síntese de NPOs, resultando na formação de NPMs esféricas e em forma de flor, indicando que moléculas de DNA desempenham papel importante no controle da morfologia⁴². Moléculas de RNA são apontadas como um excelente modelo, capaz de adotar formas estáveis e bem definidas e altamente dependentes de sua sequência. Devido a esse fato, essas moléculas são exploradas em técnicas *in vitro* visando à seleção de sequências de RNA que apresentam a capacidade de estabilizar a nucleação e a formação de nanopartículas de paládio hexagonais⁴³.

26.2.4 Vitaminas

O ácido ascórbico (vitamina C) é conhecido por sua propriedade antioxidante, bem como pela biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e alta solubilidade em água. Devido a essas características, o ácido ascórbico foi utilizado para sintetizar NPMs. Um estudo recente avaliou a síntese e estabilização de NPOs à temperatura ambiente, verificando que as partículas apresentaram formatos esféricos, com uma estreita faixa de distribuição de diâmetros médios (31 ± 5 , 36 ± 6 e 40 ± 5 nm), e que sua estabilidade poderia ser controlada pelo ajuste de pH do meio reacional⁴⁴.

A riboflavina (vitamina B₂) também foi utilizada como agente redutor e de proteção, devido à sua alta solubilidade em água, biodegradabilidade e baixa toxicidade em comparação com outros agentes redutores. Em rota de síntese verde utilizando a vitamina B₂ com íons de ouro ou platina à temperatura ambiente, sem a utilização de agente dispersante, ocorreu a formação de nanoesferas, nanofios e nanobastões⁴⁵. Adicionalmente, o tamanho médio das NPOs foi de $6,1 \pm 0,1$ nm e das nanopartículas de paládio foi de $4,1 \pm 0,1$ utilizando rotas de síntese semelhantes. Também foi demonstrado que a forma e tamanho das NPMs são dependentes do solvente utilizado na síntese⁴⁶.

26.3 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR BACTÉRIAS

Bactérias são muito utilizadas para a biossíntese de NPMs (Tabela 26.1). Os mecanismos que atuam na formação de NPMs por bactérias são

diversificados, podendo envolver a internalização de alguns íons, que sofrem redução no meio citoplasmático (ou periplasmático, em alguns casos), ou também podem ser reduzidos no exterior da célula, seja pela ação de metabólitos secretados ou pela ação de moléculas existentes na superfície externa da bactéria (Figura 26.2).

Algumas bactérias apresentam NPMs de forma natural, que fazem parte da sua vida no meio ambiente. Bactérias magnetotáticas (BMT) possuem naturalmente em seu interior magnetossomos, nanoestruturas formadas principalmente por óxido de ferro e sulfeto de ferro (Fe_3O_4 e Fe_3S_4 , respectivamente) que permitem que esses organismos se direcionem por meio do campo geomagnético⁶⁷.

As BMTs são capazes de biofabricar nanopartículas a partir de outros metais. *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MSR-1), por exemplo, podem formar NPOs esféricas em sua superfície por meio de bioissorção. O diâmetro das NPMs é diretamente proporcional à concentração inicial de metal e ao valor do pH do meio no qual as bactérias se encontram (na faixa de 1,5 a 4,0). O mecanismo responsável pela formação ainda é desconhecido, mas é possível que se dê por meio de proteínas de superfície⁶⁰. A mesma bactéria também pode sintetizar partículas anisotrópicas (alongadas) de telúrio em seu meio intracelular. O sistema de cristalização ainda está sendo estudado, mas pode envolver várias enzimas, e é possível que o íon de telúrio atue comoceptor final em rotas de metabolismo anaeróbico. A concentração inicial do metal afeta quanto poderá ser absorvido pelas células, pois concentrações muito altas tendem a inibir o crescimento de *M. gryphiswaldense*⁶¹.

Tabela 26.1 Síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando bactérias

| ORGANISMO | ÍON METÁLICO | DIÂMETRO (NM) | FORMA | REFERÊNCIA |
|------------------------------------|--------------|---------------|---------------------|------------|
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | Prata | 8 a 12 | Esférica | 47 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | Titânio | 40,5 | Esférica | 48 |
| <i>Anabaena flos-aquae</i> | Ferro | 103 × 20 | Bastão | 49 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Prata | 14,6 | Circular/triangular | 50 |
| <i>Bacillus funiculus</i> | Prata | 10 a 20 | Esférica | 51 |
| <i>Bacillus</i> sp. | Prata | 5 a 15 | Esférica | 52 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Níquel | — | Folha | 53 |
| <i>Brevibacterium casei</i> | Cádmio | 10 a 30 | Esférica | 54 |
| <i>Brevibacterium casei</i> | Prata | 10 a 50 | Esférica | 55 |
| <i>Brevibacterium casei</i> | Ouro | 10 a 50 | Esférica | 55 |
| <i>Calothrix pulvinata</i> | Ferro | 128 × 11 | Bastão | 49 |

| ORGANISMO | ÍON METÁLICO | DIÂMETRO (NM) | FORMA | REFERÊNCIA |
|---|----------------|---------------|-------------------|------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Ouro | 50 | Circular | 56 |
| <i>Escherichia coli</i> | Cádmio/Telúrio | 3 a 6 | Cúbica | 57 |
| <i>Geobacillus</i> sp. (ID17) | Ouro | 10 a 20 | Hexagonal | 58 |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i> | Paládio | < 5 | – | 59 |
| <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> | Ouro | 10 a 40 | Esférica | 60 |
| <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> | Telúrio | 15 × 200 | Alongada | 61 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Prata | 6,3±4,9 | Esférica/discoide | 62 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Paládio | 22,1±6,2 | Poligonal | 62 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Ferro | 20,5±5,3 | Laminar | 62 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Ródio | 2,1±0,9 | Irregular | 62 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Níquel | 2,9±1,2 | Discreta | 62 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Rutênio | 8,3±5,4 | Esférica/discoide | 62 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Platina | 450 | Discoide | 62 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Cobalto | 550 | Laminar | 62 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Lítio | 750 | Circular | 62 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | Cobre | 8 a 15 | Esférica | 63 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | Prata | 93 | Cúbica | 64 |
| <i>Streptomyces albidoflavus</i> | Prata | 10 a 40 | Esférica | 65 |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> | Prata | 50 | Irregular | 66 |

Além de bactérias que produzem naturalmente NPMs, algumas das bactérias mais utilizadas para a síntese de NPMs são reconhecidas por microbiologistas devido às suas patogenicidades a seres humanos, animais e plantas^{68,69}.

Escherichia coli (K12) produz NPOs, que se formam por meio da redução de íons pela ação de proteínas de membranas extracelulares, as quais também possuem importância na estabilização⁵⁶. *E. coli* superexpressando genes envolvidos na síntese de glutatona formam NPMs intracelulares de cádmio e telúrio (Cd e Te). Nesse caso, a glutatona atua como agente redutor desses metais e estabiliza as NPMs⁵⁷.

Streptomyces é um gênero de bactérias muito utilizado para síntese de NPPs. *S. albidoflavus* pode produzir NPMs que apresentam aminoácidos e peptídeos em sua superfície, sendo formadas tanto em meio extracelular como intracelular⁶⁵. O pigmento produzido por *S. coelicolor* foi utilizado como agente redutor de íons de prata após exposição a micro-ondas. Resultados indicam que o pigmento forma uma camada circundante nas NPMs, impedindo a sua aglomeração e permitindo a estabilização⁶⁶.

O extrato de livre de células de *Acinetobacter calcoaceticus* também promove a formação de NPPs. As NPMs se apresentam incorporadas por uma matriz orgânica composta por agentes redutores e estabilizantes secretados

pelas células. Variações no meio reacional de síntese, como temperatura e concentração de sal metálico, mostraram que as NPMs podem ter a quantidade e a morfologia alteradas⁴⁷.

NPPs produzidas extracelularmente, com uma cobertura de peptídeos, podem ser biofabricadas por *Stenotrophomonas maltophilia*. As NPMs produzidas são estáveis e possuem taxa de difusão alta. Os autores também observaram que quanto menor o tamanho da NPM, maior é a sua cinética de liberação no meio extracelular⁶⁴.

Uma espécie pertencente ao gênero *Geobacillus* (ID17) produz NPOs intracelularmente. O estudo da superfície dessas partículas revelou que o agente que as reveste possui um grupo amina aromático, sendo possivelmente uma enzima com atividade de redutase. O processo de formação de NPMs em micro-organismos que possuem tais enzimas pode ser realizado devido à transferência de elétrons de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) que reduzem íons metálicos⁵⁸.

Aeromonas hydrophila é uma bactéria formadora de nanopartículas de titânio no meio extracelular, devido à atividade redutora e estabilizante de alguns de seus metabólitos, que revestem as NPMs. A principal molécula envolvida na biofabricação é a glicil-L-prolina, possivelmente responsável pela desidratação de hidróxido de titânio⁴⁸.

Nanopartículas de cobre podem ser sintetizadas pela bactéria *Pseudomonas stutzeri*, e apresentam uma cobertura orgânica que protege a partícula contra oxidação⁶³. Srivastava e Constanti⁶² utilizaram *P. aeruginosa* para sintetizar diversas NPMs (Ag, Pd, Fe, Rh, Ni, Ru, Pt, Co, e Li) na ausência de meio de cultura. De todos os metais utilizados, apenas o cobalto e o lítio formaram partículas intracelulares. Isso sugere que esse micro-organismo possui um mecanismo de seleção único, que permite a internalização de alguns íons enquanto outros são reduzidos em suas proximidades. Dados obtidos por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) sugerem que algumas aminas primárias e secundárias são as responsáveis pela síntese extracelular de NPMs, o que não é observado para nanopartículas intracelulares.

O gênero *Bacillus* é utilizado na síntese de vários tipos de nanopartículas. *B. subtilis* é capaz de formar uma rede de óxido de grafeno e sulfeto de níquel⁵³. *B. funiculus* e *B. amyloliquefaciens* foram utilizados na síntese de NPPs, por síntese extracelular⁵¹ e na presença de radiação solar⁵⁰, respectivamente. Pugazhenthiran e colaboradores⁵² isolaram um *Bacillus* sp resistente a prata e o utilizaram para síntese periplasmática de NPPs (espaço entre a membrana externa e a citoplasmática).

Geobacter sulfurreducens é biorredutora de uma variedade de íons metálicos, dentre eles o paládio. Nanopartículas de paládio produzidas por essa bactéria se localizam no espaço periplasmático, possivelmente devido à distribuição e às propriedades de algumas enzimas redutoras. É interessante notar que, para essa reação, um aumento na proporção de células em relação à quantidade inicial de íons ocasiona um aumento na quantidade de nanopartículas sintetizadas com um diâmetro menor⁵⁹.

Brevibacterium casei biossintetiza nanopartículas fluorescentes de cádmio (CdS). Essa síntese ocorre de maneira mais eficiente quando os organismos incubados com o sal metálico se encontram na fase estacionária de crescimento. Fatores como pH e concentração inicial de íons interferem na quantidade de NPMs sintetizadas⁵⁴. Esse micro-organismo também é capaz de produzir NPPs e NPOs. As evidências experimentais mostram que os agentes biorredutores nessa bactéria são proteínas secretadas⁵⁵.

Já micro-organismos fotossintetizantes, como as cianobactérias *Calothrix pulvinata* e *Anabaena flos-aquae*, são capazes de produzir em meio intracelular nanobastões de ferro⁴⁹. Para a reação, Brayner e colaboradores⁴⁹ utilizaram concentrações equimolares de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} para formação das nanoestruturas, pois foi verificado que os organismos resistiam melhor a essa situação de cultura.

Como foi visto, a abundante biodiversidade de bactérias apresenta grande potencial para sintetizar NPMs com as mais diversas aplicações. Algumas das rotas de formação das NPMs já foram elucidadas; contudo, diversos mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares, que estão envolvidos em algumas sínteses, ainda são pouco conhecidos. Para isso, vários fatores, como meios de cultivo, condições de crescimento, extração de moléculas, concentrações iônicas e tempo de reação, por exemplo, podem ser investigados e explorados a fim de tentar elucidar esses mecanismos, bem como aperfeiçoar e padronizar as rotas de síntese de NPMs utilizando esses micro-organismos.

26.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR ALGAS

O ecossistema aquático ocupa aproximadamente 70% da superfície da Terra e contém uma expressiva biodiversidade e ampla variabilidade de compostos a serem explorados. Esses recursos biológicos são fontes ricas de agentes redutores (incluindo alcaloides, compostos fenólicos e proteínas), precursores de moléculas como a sílica, o cálcio, a quitosana e também de

agentes estabilizadores como os polissacarídeos, os lipídeos, os peptídeos, entre outros⁷⁰. Entretanto, apesar de o ecossistema aquático apresentar um alto potencial para a síntese de NPMs o seu uso é pouco explorado^{9,70}. As algas são importantes representantes do ecossistema aquático e apresentam uma grande diversidade na sua composição química, que é influenciada por mudanças ambientais (temperatura, nutrientes, salinidade, entre outros), bem como por interações bióticas⁷¹. Nesse contexto, as algas são fontes biológicas para a síntese de NPMs (Tabela 26.2).

Tabela 26.2 Síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando algas

| ORGANISMO | ÍON METÁLICO | DIÂMETRO (NM) | FORMA | REFERÊNCIA |
|----------------------------------|--------------|---------------|---------------------|------------|
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | Prata | 5 a 35 | Circular/retangular | 72 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Prata | < 15 | — | 73 |
| <i>Cladosiphon okamurus</i> | Ouro | 8 a 10 | Esférica | 74 |
| <i>Diademesmis gallica</i> | Ouro | 22 | Esférica | 75 |
| <i>Gelidiella acerosa</i> | Prata | 22 | Esférica | 76 |
| <i>Kjellmaniella crassifolia</i> | Ouro | 8 a 10 | Esférica | 74 |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> | Prata | < 15 | — | 73 |
| <i>Navicula atomus</i> | Ouro | 9 | Esférica | 75 |
| <i>Sargassum wightii</i> | Ouro | 5 a 15 | Laminar | 77 |
| <i>Sargassum wightii</i> | Ferro | 18 | Cúbica | 78 |
| <i>Ulva fasciata</i> | Prata | 9 a 19 | — | 79 |

NPPs foram sintetizadas utilizando a alga *Sargassum wightii* e apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*^{77,80}. Um controle significativo para *Xanthomonas campestris* sp v. *Malvacearum* foi obtido por NPPs sintetizadas a partir de extratos de *Ulva fasciata*⁷⁹. A macroalga de coloração vermelha *Gelidiella acerosa* tem uma significativa importância econômica devido à alta qualidade do seu ágar. Além disso, essa alga tem o potencial de sintetizar NPPs com atividade fungicida para *Mucor indicus*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium dimerum* e *Humicola insolens*⁷⁶. Adicionalmente, as microalgas *Navicula atomus* e *Diademesmis gallica* podem sintetizar, *in vivo*, NPOs⁷⁵.

A biossíntese de NPPs por *Chlamydomonas reinhardtii* *in vivo* foi mais rápida quando comparada com a síntese *in vitro* (extrato). Nesse caso, a

síntese *in vivo* foi localizada no citoplasma, no núcleo e no flagelo⁷². Visando demonstrar a possível ação de proteínas nessa síntese, foram testados extratos com e sem proteínas. Como resultado, a fração livre de proteínas apresentou uma síntese lenta, com a obtenção de NPMs maiores, sugerindo a participação dessa classe de biomoléculas na síntese⁷².

O fucoïdan é um polissacarídeo obtido a partir de algas marinhas *Cladosiphon okamurnus* (o-fucoïdan) e *Kjellmaniella crassifolia* (t-fucoïdan), sendo utilizado para reduzir e estabilizar NPOs⁷⁴. NPPs foram sintetizadas a partir de extratos aquosos de polissacarídeos provenientes das algas *Pterocladia capillaceae*, *Jania rubins*, *Ulva fasciata* e *Colpomenia sinusa*. As suspensões coloidais das NPMs formadas apresentaram atividade antimicrobiana⁸¹.

A contaminação por metais pesados em ambientes aquáticos constitui um sério problema, e uma estratégia utilizada para minimizá-la é o uso de microalgas para a biorremediação. As microalgas são capazes de sequestrar metais pesados por adsorção e também pela produção de fitoquelatinas (as quais são produzidas, principalmente, por algas, plantas e fungos) e estão relacionadas com a detoxificação de metais pesados presentes no ambiente pela formação de um complexo estável metal-fitoquelatina, o qual se constitui como uma NPM⁹.

Desse modo, as algas apresentam potencial para sintetizar NPMs com aplicações promissoras. Entretanto, os mecanismos envolvidos na síntese de NPMs por algas são escassos e não há um consenso sobre quais transcorreriam em cada situação.

26.5 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR FUNGOS

Fungos são seres micro ou macroscópicos capazes de exercer diversos impactos no meio ambiente e no ser humano, tanto de forma negativa (doenças) quanto positiva (produção de alimentos e antibióticos)⁸². Devido aos componentes biológicos presentes nas suas estruturas celulares, envolvidos em seus processos metabólicos, pode haver potencial para bioacumulação e tolerância a metais. Por isso, os fungos estão presentes em diversos estudos sobre geração biológica de NPMs, uma vez que podem ser obtidos em larga escala, além de propiciar viabilidade econômica para produção¹². Os fungos produzem principalmente proteínas (enzimas secretadas) como potenciais formadores de NPMs (Tabela 26.3). Além disso, podem apresentar formação

intra ou extracelular de NPMs (Figura 26.2). Exemplos das espécies utilizadas em rotas de síntese verde são *Volvariella volvacea*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Schizosaccharomyces pombe*^{18,19,83-86}.

Tabela 26.3 Síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando fungos

| ORGANISMO | ÍON METÁLICO | DIÂMETRO (NM) | FORMA | REFERÊNCIAS |
|---------------------------------|-----------------------|---------------|-------------------------------------|-------------|
| <i>Candida glabrata</i> | Cádmio | 2 | Esférica | 87 |
| Levedura MKY3 | Prata | 2 a 5 | Hexagonal | 88 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Antimônio | 2 a 10 | Esférica | 89, 90 |
| <i>Schizosaccharomyces</i> | Cádmio | 1 a 1,5 | Hexagonal | 83 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | Ouro | 15 | Hexagonal/triangular | 89, 91 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Zinco | 42 | — | 92 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Silício | 5 a 15 | Quase esférica | 89, 93 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Titânio | 6 a 13 | Esférica | 89, 93 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Platina | 10 a 100 | Variada | 94 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Prata | 16 a 30 | — | 95 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Prata | 5 a 25 | Esférica/triangular | 85 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | Prata | 5 | Quase esférica | 96 |
| <i>Coriolus versicolor</i> | Prata | 25 a 75 | Esférica | 97 |
| <i>Volvariella volvacea</i> | Ouro/Prata/Ouro-Prata | 15 a 150 | Triangular/quase esférica/hexagonal | 18 |

26.5.1 Fungos ascomicetos

Estudos mostraram que *Fusarium oxysporum* produz NPPs extracelularmente, provavelmente por meio de proteínas, dentre elas uma redutase dependente de NADH. Contudo, também foi relatado que essa enzima não está presente em todos os fungos, podendo justificar o estudo em que *F. moniliforme* não participa da formação intra ou extracelular de NPPs^{84,98}. Outro estudo observou a redução de íons metálicos na presença de redutase dependente de nitrato e uma quinona de transporte extracelular, assim como síntese de NPMs utilizando enzima purificada de *F. oxysporum*, fitoquelatina

e 4-hidroxiquinolina; mas na ausência de um desses componentes não ocorre produção de NPMs^{98,99}. Em estudo recente, nanopartículas esféricas de 42 nm de sulfeto de zinco (ZnS) foram sintetizadas utilizando *F. oxysporum*⁹². Em outro estudo, nanopartículas de silício e de titânio com 5 nm a 15 nm e 6 nm a 13 nm, respectivamente, foram produzidas extracelularmente com *F. oxysporum* em contato com complexos aniônicos SiF_6^{2-} (hexafluoreto de silício iônico) e TiF_6^{2-} (hexafluoreto de titânio iônico). As nanopartículas de titânio foram formadas à temperatura ambiente, e as de silício a 300 °C^{89,93}. *F. oxysporum* também produziu nanopartículas de platina na presença de ácido hexacloplatínico. Interessantemente, houve a produção intracelular, além da formação extracelular de NPMs. O tamanho das NPMs variou entre 10 nm e 100 nm com formas hexagonais, pentagonais, esféricas, quadradas e retangulares⁹⁴. Um estudo mais recente mostrou a produção de NPPs com tamanho entre 16 nm e 30 nm pelo fungo *F. oxysporum*, as quais apresentaram atividade contra fungos e bactérias⁹⁵.

Aspergillus fumigatus também realiza síntese extracelular de NPMs utilizando filtrado de células, com NPPs dispersas com diâmetro de 5 nm a 25 nm e com forma esférica e triangular⁸⁵. Em outro estudo, *Trichoderma harzianum* quando em contato com íons prata mostrou acúmulo de NPPs na superfície de sua parede celular. Após banho de ultrassom, as NPMs em suspensão apresentaram-se razoavelmente monodispersas, cristalinas e quase esféricas, com um diâmetro médio de aproximadamente 5 nm⁹⁶.

As leveduras são fungos que possuem um citoplasma circundado por um envelope composto de membrana plasmática, espaço periplasmático e parede celular. Essa estrutura celular apresenta moléculas como proteínas, polissacarídeos, lipídeos, ácidos nucleicos e metabólitos que tornam as leveduras bastante utilizadas em bioprocessos. A concentração dessas moléculas atua diretamente nas rotas de síntese verde de NPMs envolvendo leveduras⁹⁸, variando de acordo com a espécie e sendo geralmente influenciada pelas condições de crescimento¹⁰⁰.

O fato de proteínas como enzimas transferirem elétrons para íons metálicos, reduzindo-os, faz dessas biomoléculas as principais responsáveis pelo uso de leveduras na síntese de NPMs¹⁰¹. Além disso, grande parte das leveduras tem a capacidade de acumular metais por mecanismos físicos e biológicos, ligando-os a metabólitos ou biopolímeros específicos e possibilitando o seu acúmulo de uma maneira dependente de metabolismo^{86,102}. Por esse motivo, leveduras promovem a formação de NPMs por rota intracelular, extracelular ou mesmo ligado à parede celular (Figura 26.2) a partir de íons de prata, ouro, zircônio, titânio, ferro, cádmio, entre outros¹⁰³.

Krumov e colaboradores¹⁰⁴ mostraram que a formação de nanocristais de CdS, por exemplo, depende da especificidade da cepa e das condições de cultivo das leveduras. Nesse mecanismo, as macromoléculas contribuintes são a glutationa (GSH), metalotioninas e fitoquelatinas. A biomineralização do cádmio pelas leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida glabrata* evidencia uma biotransformação do metal, na qual íons Cd^{2+} são sequestrados com pequenos peptídeos seletivos e coprecipitados com enxofre inorgânico, originando *clusters* de CdS atóxicos¹⁰⁴.

Em cultura de *Candida glabrata*, a presença de íons Cd^{2+} levou à formação intracelular de pontos quânticos (semicondutores) de CdS. Essas NPMs foram obtidas por neutralização, obtendo-se cristais de CdS monodispersos de forma esférica e ligados a peptídeos com diâmetro aproximado de 2 nm⁸⁷. As leveduras do gênero *Schizosaccharomyces* também produzem nanopartículas de CdS intracelularmente quando em contato com solução de cádmio e com dimensões em torno de 1 nm a 1,5 nm. Essas NPMs foram destinadas à fabricação de um diodo com a junção de poli (*p*-fenilenovinileno) com características consideradas ideais para o material⁸³.

Yarrowia lipolytica (NCIM 3589) foi utilizada na síntese de NPOs, e análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) mostraram que as NPMs produzidas estavam associadas à parede celular da levedura. O estudo mostrou a formação de NPOs hexagonais e triangulares por causa da nucleação na superfície das células que deram origem à cor dourada na região do visível (540 nm) em pH 7,0 e cores rosa e roxo em pH 9,0, com um diâmetro médio de aproximadamente 15 nm^{89,91}. Em contrapartida, *Saccharomyces cerevisiae*, levedura utilizada como fermento de pães, produziu nanopartículas de óxido de antimônio (Sb_2O_3) à temperatura ambiente. As NPMs apresentaram forma esférica com células unitárias cúbicas de face centrada, diâmetro variando entre 2 nm e 10 nm e propriedades semicondutoras^{89,90}. Em outro estudo, a variedade de levedura MKY3, tolerante à prata, produziu extracelularmente NPPs hexagonais de tamanho entre 2 nm e 5 nm. As NPMs foram obtidas quando leveduras MKY3 em fase logarítmica de crescimento foram desafiadas com prata solúvel⁸⁸.

Outro estudo mostrou que o rendimento final de nanopartículas de CdS foi determinado pela concentração inicial de glicose no meio de cultura, que está diretamente relacionada com a concentração final de biomassa e o nível de concentração de CdS no meio reacional. Adicionalmente, foi observado que a formação de nanopartículas de CdS depende do momento em que o metal cádmio é disponibilizado para a célula, o que desencadeia uma reação

proteica devido ao estresse à qual foi submetida. A adição de cádmio no intervalo médio de crescimento até o fim da fase estacionária forneceu maior produção de NPMs. Outro fator a ser considerado para a geração de um melhor rendimento de NPMs é o tempo de reação. Foi observado que uma concentração máxima de cádmio nas células é medida em aproximadamente 24 horas após a adição de cádmio ao meio com a levedura. Contudo, 10 horas após a concentração máxima de cádmio ser alcançada observa-se uma diminuição nos níveis intracelulares^{87,104}.

26.5.2 Fungos basidiomicetos (cogumelos)

Dentre os cogumelos utilizados em síntese de NPMs está o *Coriolus versicolor*, o qual sintetiza moléculas capazes de reduzir íons prata e revestir as NPMs. Na síntese, as NPPs se formaram pelo contato do fungo com solução de nitrato de prata, permitindo o acúmulo de NPMs na superfície em um período de 72 horas. Em condições alcalinas os grupos tióis da superfície do fungo tiveram um papel importante na aceleração da síntese à temperatura ambiente. As NPPs apresentaram diâmetro entre 25 nm e 75 nm, forma esférica por microscopia de força atômica (MFA) e MET, e a análise por FTIR indicou a presença de grupos amino, oriundos de proteínas, provavelmente responsáveis pela estabilidade⁹⁷.

Em outro estudo, foi realizada a síntese extracelular em meio aquoso com extrato do cogumelo comestível *Volvariella volvacea* como agente redutor e estabilizante de nanopartículas de Au, Ag e Au-Ag. As NPOs apresentaram forma de nanoprismas triangulares, quase esféricos e hexagonais entre 15 nm e 150 nm de diâmetro. As NPMs preparadas por corredução de Au-Ag apresentaram apenas uma banda plasmônica devido à liga dos constituintes e apresentaram fotoluminescência e alta cristalinidade. Análises por FTIR mostraram que as NPOs estavam ligadas a proteínas pelos grupos amino livres e as NPPs por meio do grupo carboxilato dos resíduos de aminoácidos¹⁸.

Como observado pela revisão da literatura na área, existem diversas espécies de fungos que podem ser utilizadas na síntese de NPMs, além de vários íons metálicos que podem ser biorreduzidos. Desse modo, a síntese verde com fungos envolve um sistema microbiológico com capacidade de acumular várias espécies metálicas. Nesse contexto, o êxito na produção de NPMs por fungos está diretamente relacionado com a linhagem, meio de cultivo adequado, tempo de síntese, quantidade de metal e momento de adição do íon

metálico; fatores que estão diretamente relacionados ao perfil bioquímico de leveduras e demais fungos, juntamente com suas condições de crescimento.

26.6 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR PLANTAS

A síntese verde de NPMs mediada por plantas, seja utilizando um extrato ou o próprio organismo vivo, é atualmente a mais reportada na literatura^{13,20}. As plantas utilizam metabólitos (incluindo flavanoides, terpenoides, saponinas e polifenóis) e proteínas para diversos aspectos relacionados à sua fisiologia. Essas mesmas moléculas são as responsáveis por fazer das plantas um dos principais reatores e fornecedores de moléculas para rotas de síntese verde^{16,105}. Desse modo, atualmente é aceito que plantas produzam uma gama de metabólitos que podem atuar, possivelmente de maneira sinérgica, na redução de íons metálicos e/ou na estabilização das NPMs. Acredita-se que os principais compostos responsáveis pela redução de íons metálicos por plantas são os aminoácidos, o ácido cítrico, os flavonoides, os compostos fenólicos, os terpenoides, os compostos heterocíclicos, as enzimas, o CO₂ intracelular, as proteínas de membrana, os peptídeos, os polissacarídeos, as saponinas, o ácido tânico, entre outros¹⁰⁶.

O número de publicações relacionadas à síntese verde de NPMs utilizando extratos de plantas tem crescido e, embora o(s) composto(s) da planta que atue(m) na redução e/ou estabilização das NPMs algumas vezes seja(m) identificado(s), o mecanismo específico da síntese verde mediada por plantas ainda não foi estabelecido^{98,106}. Isso deriva do fato de que diferentes plantas apresentam composições, concentrações e combinações variadas desses agentes redutores, o que em última instância define a eficiência do extrato na formação de NPMs¹⁰⁷.

Um número expressivo de espécies de plantas é encontrado na natureza, e muitas são candidatas para síntese de NPMs¹³. A literatura científica sinaliza para a eficácia no uso de plantas na síntese verde de NPMs, visto que muitos estudos demonstraram o potencial redutor de íons metálicos por extratos de diferentes espécies (Tabela 26.4). Diversas plantas comumente conhecidas já foram utilizadas como fontes geradoras de NPMs, tais como: *Medicago sativa* (alfafa), *Aloe vera* (babosa), *Glycine max* (soja), *Camellia sinensis* (chá), *Syzygium cumini* (jamelão), *Bauhinia variegata* (pata-de-vaca), *Cedrus deodara* (cedro-do-himalaia), *Lonicera japônica* (madressilva), *Elaeocarpus sphaericus*, *Sesbania grandiflora*, entre outras^{105,108-112}.

Outro aspecto relevante no que concerne à síntese verde de NPMs por plantas é o fato de que diferentes partes vegetais (como por exemplo, folhas, sementes, cascas, raízes e outras) podem produzir partículas com características distintas, e, por esse motivo, devem ser consideradas separadamente. A planta *Ocimum sanctum* (manjerição-santo) foi utilizada para sintetizar NPPs com diâmetros de 25 nm a 40 nm a partir de um extrato feito com as folhas da planta¹¹³. Sínteses com a mesma planta foram realizadas utilizando extratos de caule e de raiz, mas nesse caso os diâmetros médios das NPMs foram de 10 nm e 5 nm, respectivamente¹¹⁴. Esses dados indicam a diferença nos parâmetros do produto final da síntese de acordo com a parte da planta escolhida para a formação do extrato. Em cada parte da planta há um perfil de fitoquímicos com diferentes concentrações, de acordo com a necessidade de cada tecido e com o tipo de estresse ao qual a planta possa estar submetida (incluindo temperatura e umidade)¹³.

Conforme explicitado, a síntese de NPMs utilizando extratos de diferentes partes de plantas tem sido amplamente explorada. Os extratos derivados das folhas são a escolha mais comum para realizar a síntese verde a partir de plantas, mas o uso do extrato de sementes, cascas, flores, frutos, tubérculos e raízes também foi reportado. Sendo assim, o material de origem (parte da planta), conjuntamente com a época do ano ou local de coleta do extrato da planta, bem como a presença de agentes estressores abióticos (presença de metais, agrotóxicos, entre outros) ou bióticos (presença de pragas ou patógenos), apresenta grande influência na síntese e nas características das NPMs.

Tabela 26.4 Síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando extratos de plantas

| ORGANISMO | ÍON METÁLICO | DIÂMETRO | FORMA | REFERÊNCIAS |
|---|--------------|-------------------|----------------------|-------------|
| <i>Aloe vera</i> (babosa) | Prata | 15,2 nm | Esférica | 109 |
| <i>Aloe vera</i> | Ouro | — | Triangular | 109 |
| <i>Aloe vera</i> | Índio | 5 nm a 50 nm | Cúbica | 131 |
| <i>Acalypha indica</i> | Prata | 20 nm a 30 nm | — | 132 |
| <i>Anacardium occidentale</i> L. (caju) | Prata | 4 nm | Esférica | 129 |
| <i>Callicarpa maingayi</i> | Prata | 12,4 nm | — | 119 |
| <i>Capsicum annuum</i> L. (pimentão) | Prata | 10 nm a 40 nm | Esférica | 117 |
| <i>Cinnamomum camphora</i> (cânfora) | Paládio | 3,2 nm a 6 nm | — | 133 |
| <i>Cinnamomum camphora</i> | Prata | 64,8 nm | — | 116 |
| <i>Cinnamomum camphora</i> | Ouro | 21,5 nm a 23,4 nm | Triangular/ esférica | 116 |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela) | Ouro | 25 nm | Esférica/ prismática | 115 |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela) | Prata | 31 nm a 40 nm | Cúbica | 122 |

| ORGANISMO | ÍON METÁLICO | DIÂMETRO | FORMA | REFERÊNCIAS |
|--|--------------|------------------|-----------------------|-------------|
| <i>Cocos nucifera</i> L. (coco) | Ouro | 10 nm | Esférica | 130 |
| <i>Coriandrum sativum</i> (coentro) | Ouro | 6,7 nm a 57,9 nm | Variada | 134 |
| <i>Cuminum cyminum</i> (cominho) | Ouro | 1 nm a 10 nm | Esférica | 126 |
| <i>Diospyros kaki</i> (caquizeiro) | Platina | 2 nm a 12 nm | Cristalina | 135 |
| <i>Gardenia jasminoides</i> (gardênia) | Paládio | 3 nm a 5 nm | — | 136 |
| <i>Glycine max</i> (soja) | Paládio | 15 nm | Esférica | 137 |
| <i>Helianthus annuus</i> | Ouro | 30 nm a 50 nm | — | 127 |
| <i>Medicago sativa</i> (alfafa) | Prata | 5 nm a 51 nm | Esférica | 125 |
| <i>Mentha piperita</i> (hortelã) | Prata | 90 nm | Esférica | 138 |
| <i>Mentha piperita</i> | Ouro | 150 nm | Esférica | 138 |
| <i>Nyctanthes arbortristis</i> | Ouro | 19 nm | Esférica | 128 |
| <i>Ocimum tenuiflorum</i> (manjerição-pequeno) | Prata | 25 nm a 40 nm | Esférica | 113 |
| <i>Ocimum sanctum</i> (manjerição-sagrado) | Prata | 5 nm e 10 nm | Esférica | 114 |
| <i>Papaver somniferum</i> | Prata | 3,2 µm a 7,6 µm | Esférica | 124 |
| <i>Prosopis juliflora</i> | Prata | — | Cúbica | 139 |
| <i>Rhododendron dauricum</i> | Prata | 25 nm a 40 nm | Esférica | 140 |
| <i>Sebasnia grandiflora</i> | Prata | 10 nm a 25nm | Esférica | 112 |
| <i>Sorbus aucuparia</i> | Prata | 16 nm | Esférica | 141 |
| <i>Sorbus aucuparia</i> | Ouro | 18 nm | Triangular/ hexagonal | 141 |
| <i>Tamarindus indica</i> L. (tamarindo) | Ouro | 20 nm a 40 nm | Cristalina | 142 |
| <i>Tephrosia purpurea</i> (indigo-selvagem) | Prata | 20 nm | Esférica | 143 |
| <i>Trachyspermum ammi</i> | Prata | 87 nm a 998 nm | Triangular | 124 |

26.6.1 Folhas

De acordo com o potencial redutor das biomoléculas encontradas nos extratos das folhas, pode-se obter NPMs de diferentes formas e tamanhos. Uma pesquisa realizada com síntese verde de NPOs com extrato das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) mostrou uma relação entre a quantidade de extrato e a forma das NPMs obtidas. Com maior quantidade de extrato, as NPMs adotaram uma forma esférica, enquanto que, com menor quantidade, uma forma prismática^{115,116}.

Além da variação das características de NPMs obtidas por diferentes extratos, pode-se variar algumas outras condições da síntese, como tempo de reação, concentração de extrato e/ou íons metálicos, temperatura e pH, visando otimizar o rendimento e rapidez da reação para que ela assemelhe aos padrões típicos de síntese química. O tamanho das NNPs sintetizadas utilizando extrato de *Capsicum annuum* L. (pimentão) aumentou de acordo com o tempo de reação. A síntese durante 5, 9 ou 13 horas de reação formou

NPPs com aproximadamente 10 nm, 25 nm e 40 nm, respectivamente¹¹⁷. Outro estudo avaliou a eficiência da síntese de NPPs com variações nas temperaturas de reação e utilizando extratos das folhas de *Pinus densiflora* (pinho-vermelho-japonês), *Diospyros kaki* (caqui), *Ginkgo biloba*, *Magnolia kobus* e *Platanus orientalis*. Os resultados indicaram que a síntese com extrato de *Magnolia kobus* a 95 °C foi a mais eficiente, capaz de reduzir 90% do nitrato de prata em apenas 11 minutos¹¹⁸. Esse resultado compara-se em eficiência ao uso de compostos químicos convencionais. Sendo assim, vale ressaltar a importância da variação dos parâmetros da síntese para obtenção de NPMs com as características almejadas.

Além da síntese de NPMs a partir de metais nobres, extratos de folhas são utilizados para sintetizar nanopartículas de outros metais com sucesso, como a platina e o paládio¹⁰⁶. A síntese verde de NPMs também pode ocorrer com a planta *in vivo*⁹. As plantas respondem ao estresse gerado pela presença de metais por um processo de complexação desses metais via produção de fitoquelantes ou de peptídeos quelantes de metais¹¹⁴. Entretanto, esse processo é mais lento e possui o custo alto.

26.6.2 Casca

Alguns estudos têm demonstrado a biossíntese de NPMs a partir de extrato da casca. O extrato metanólico da casca de *Callicarpa maingayi* atua como agente redutor e estabilizador na síntese de NPPs. Análises por MET indicaram NPPs de formato cúbico com diâmetros médios de $12,40 \pm 3,27$ nm e carga de superfície de $35,5 \pm 3,7$ mV¹¹⁹. A biossíntese de NPPs foi realizada utilizando extrato aquoso da casca de *Ficus racemosa* (figueira), e sua atividade larvicida foi demonstrada contra larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Culex gelidus*, importantes vetores de doenças¹²⁰. NPPs foram sintetizadas utilizando extratos de *Avicennia marina* de diferentes partes da planta (folhas, cascas e raízes), sendo demonstrada que a menor taxa de formação ocorreu na presença de extrato da casca. As NPMs sintetizadas promoveram a inibição de crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*¹²¹. A avaliação do extrato de casca de *Cinnamon zeylanicum* para a síntese de NPMs resultou em NPPs cúbicas e hexagonais com tamanho variando entre 31 nm a 40 nm, com atividade bactericida¹²². NPPs biossintetizadas utilizando extratos da casca do caule de *Boswellia* foram avaliados contra micro-organismos patogênicos dos gêneros *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*,

Bacillus, *E. coli*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia* e *Rhizopus*, indicando que essas NPMs possuem eficácia alta contra diferentes micro-organismos¹²³.

26.6.3 Sementes

Vijayaraghavana e colaboradores¹³⁴ compararam a eficiência de extratos obtidos a partir da semente de *Trachyspermum ammi* (ajowan) e *Papaver somniferum* (papoula-do-oriental) na formação de nanopartículas de prata. Utilizando a mesma concentração de ambos os extratos, *T. ammi* formou partículas com formato triangular com diâmetro médio variando entre 87 nm e 998 nm, enquanto *P. somniferum* resultou em partículas micrométricas esféricas com tamanho entre 3,2 μm e 7,6 μm ¹²⁴.

Concentrações variadas de extrato aquoso de sementes de *Medicago sativa* (alfafa) foram utilizadas como agente redutor para síntese de nanopartículas de prata. As maiores e as menores concentrações utilizadas levaram à formação de NPMs de formatos esféricos e diâmetros variando de 5 nm a 51 nm e NPMs de formatos hexagonais e triangulares com comprimentos das arestas de 86 nm a 108 nm, respectivamente. Adicionalmente, os tamanhos e formas das NPMs também foram modulados variando a concentração do íon metálico e do pH do meio reacional¹²⁵.

O extrato de sementes de *Cuminum cyminum* (cominho) foi utilizado na biossíntese de NPOs. Os efeitos da temperatura e do pH foram avaliados, demonstrando que, quando a reação é submetida a temperaturas mais altas, são formadas NPMs de formato esférico e tamanho monodisperso entre 1 nm e 10 nm¹²⁶.

26.6.4 Outras partes das plantas

O potencial redutor e estabilizante de extratos obtidos a partir de flores também tem sido explorado para a síntese de NPMs. O extrato aquoso de flores de *Helianthus annuus* (girassol) foi utilizado na síntese de NPOs. Análises por microscopia eletrônica de transmissão apresentaram NPOs polidispersas que variaram de 30 nm a 50 nm, as quais apresentaram atividade antimicrobiana¹²⁷. Outro estudo explorou o potencial redutor e estabilizante de extrato etanólico de flores de *Nyctanthes arbor-tristis* na síntese de NPOs, obtendo partículas esféricas com diâmetro médio seco de $19,8 \pm 5,0$ nm¹²⁸.

NPPs esféricas com 4 nm e dispersão uniforme foram obtidas a partir da goma de *Anacardium occidentale* L. (caju), apresentando atividade contra bactérias gram-negativas¹²⁹. Adicionalmente, já foi demonstrado que água de coco obtida a partir de frutos de *Cocos nucifera* L., pode ser agente redutor na síntese de NPOs, formando partículas esféricas com diâmetro médio seco de $10,5 \pm 5$ nm, as quais não apresentaram citotoxicidade a linhagens celulares de câncer cervical humano (HeLa) e câncer de mama humano (MCF-7)¹³⁰. Sendo assim, a utilização de outros tecidos e fluidos vegetais, como por exemplo, seivas brutas e elaboradas, podem ser boas alternativas.

26.7 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR OUTROS ORGANISMOS/CÉLULAS/VÍRUS

Os animais também podem ser considerados como uma fonte promissora para a síntese de NPMs. Entretanto, apesar do potencial de oxirredução bem descrito para inúmeros tecidos, a sua utilização em rotas de síntese verde de NPMs é escassa quando comparada à utilização de plantas, bactérias ou outros organismos. O cultivo de células não tumorais (células embrionárias de rim – HEK-293) e tumorais (HeLa e células epiteliais malignas do colo do útero – SiHa) resultaram na síntese de NPOs^{9,144}.

Os vírus podem ser modelos de nucleação e montagem de materiais inorgânicos¹², como candidatos em potencial para a síntese de NPMs. O vírus do mosaico do feijão foi utilizado como agente de nucleação na mineralização de materiais¹⁴⁵. O vírus do mosaico do tabaco é constituído por subunidades proteicas que atuam na formação de nanotubos¹⁴⁶. Adicionalmente, o vírus do mosaico do tabaco foi utilizado com sucesso na mineralização de nanofios cristalinos de sulfeto de chumbo (PbS), por meio de peptídeos exibidos na superfície dos bacteriófagos¹⁴⁷.

A aplicação de micro-organismos, incluindo as bactérias e os fungos, é realizada com sucesso na síntese verde. Assim, um estudo recente avaliou a potencialidade de síntese de NPMs por protozoários. *Leishmania* sp promoveu a síntese de NPPs e NPOs, com diâmetros variando de 10 nm a 100 nm e de 50 nm a 100 nm, respectivamente¹⁴⁸.

26.8 DIFERENÇAS ENTRE OS ORGANISMOS UTILIZADOS PARA A SÍNTESE VERDE

A síntese verde de NPMs utilizando micro-organismos é de produção escalonável, benigna ao meio ambiente e muitas vezes ideal para aplicações biomédicas por oferecer biocompatibilidade. Organismos em cultura apresentam ainda diversas vantagens adicionais sobre outros organismos em rotas de síntese verde. Esse fato está relacionado à facilidade de crescimento *in vitro*, multiplicação rápida, manuseio fácil e controle das condições experimentais, os quais acarretam em um aumento na reprodutibilidade na síntese das NPMs¹⁴⁹. Porém, a produção por micro-organismos tem um custo financeiro muito mais alto do que a síntese mediada, por exemplo, a partir de extratos de plantas. Assim, o uso de plantas para promover a biossíntese de NPMs se caracteriza por ser um método mais rápido e de alta eficiência, especialmente quando metais nobres, como prata e ouro, são utilizados¹⁵⁰. Adicionalmente, há a oportunidade de realizar a síntese em apenas um passo, além do fato de que a planta pode prover agentes estabilizantes que podem até mesmo atuar como bioativos¹⁵¹. Entretanto, um aspecto ainda desafiante da síntese verde com plantas é a homogeneidade na produção dos extratos e, conseqüentemente, a reprodutibilidade das NPMs sintetizadas.

26.9 PROTOCOLO PRÁTICO DE SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A síntese verde de NPMs envolve o uso de íons metálicos, obtidos geralmente a partir de sais; e agentes redutores, que podem ser moléculas, tais como os carboidratos, as proteínas, os peptídeos, os aminoácidos, os ácidos nucleicos, os nucleotídeos, as vitaminas; ou os metabólitos secundários, como os flavanoides, os terpenoides, as saponinas ou os polifenóis; ou ainda que possam ser obtidos de organismos biológicos.

Embora não exista uma descrição única para todos os mecanismos envolvidos no crescimento de NPMs, pode-se postular um modelo que contemple as etapas envolvidas na formação das partículas independente do agente redutor envolvido na etapa de síntese. Sendo que as principais etapas consistem em: (1) redução de um sal metálico, por um agente redutor, formando átomos metálicos neutros; (2) os átomos metálicos neutros colidem uns com os outros, formando um núcleo estável, seguido pelo crescimento das NPMs pelo esgotamento dos íons metálicos livres; (3) processo de estabilização

das NPMs realizada pela molécula redutora ou outras moléculas presentes no meio reacional, que estabilizam as partículas formadas, impedindo a aglomeração.

Os protocolos apresentados a seguir fazem parte do acervo de protocolos desenvolvidos ou adaptados pelos pesquisadores, estudantes e colaboradores do Grupo de Nanotecnologia e Biologia Sintética, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Materiais para síntese verde de nanopartículas metálicas

- Material biológico (biomoléculas, células, tecidos, órgãos ou seus respectivos extratos, exsudatos ou sobrenadantes)
- Meios de cultura (células eucarióticas e procarióticas)
- Cloretos metálicos (alumínio, bário, cádmio, cálcio, cobalto, cobre, cromo, estrôncio, ferro, lítio, magnésio, manganês, mercúrio, níquel, ouro, paládio, potássio, prata, platina, sódio, zinco, entre outros)
- Nitratos metálicos (alumínio, bário, bismuto, cádmio, cálcio, cério, chumbo, cobalto, cobre, cromo, estrôncio, ferro, lantânio, lítio, magnésio, manganês, mercúrio, níquel, potássio, prata, sódio, tório, urânio, zinco, entre outros)
- Acetatos metálicos (alumínio, bário, cádmio, cálcio, chumbo, cobre, magnésio, mercúrio, sódio, zinco, entre outros)
- Sulfatos metálicos (alumínio, bário, cádmio, cálcio, cério, cobre, ferro, lítio, magnésio, manganês, mercúrio, níquel, potássio, prata, sódio, zinco)
- Carbonatos de metálicos (bário, bismuto, cálcio, chumbo, cobre, estrôncio, lítio, potássio, sódio, entre outros)
- Citratos metálicos (ferro, potássio, sódio, entre outros)
- Fosfatos metálicos (potássio, sódio, cálcio, entre outros)
- Microplacas de 96 e 384 poços de fundo chato para leitoras de microplacas
- Vidrarias (béqueres, Erlenmeyers, balões de fundo chato, tubo de ensaio, funil, bastão de vidro)
- Papel-alumínio
- Cubetas plásticas para espectrofotometria
- Tubos tipo Falcon ou microtubos (0,6 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 15 mL e 50 mL)
- Água destilada e ultrapura
- Membranas filtrantes

- Micropipetas (2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1.000 μ L, 5.000 μ L e 10.000 μ L)
- Ponteiras para micropipetas

Equipamentos para síntese verde de nanopartículas metálicas

- Estufa
- Banho-maria
- Leitora de microplacas ou espectrofotômetro com comprimentos de onda variáveis no UV/Vis para monitoramento da formação de nanopartículas
- Capela com fluxo laminar (cabine de segurança biológica)
- Centrífuga
- Agitador tipo *shaker* orbital de bancada com aquecimento
- Geladeira
- Freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vertical/horizontal
- pHmetro

Métodos

Os métodos que seguem podem ser adaptados para rotas de síntese verde com outros agentes redutores (moléculas, extratos ou células) ou íons metálicos. Para fins de clareza e simplicidade das metodologias apresentadas, os métodos escolhidos foram baseados no uso de nitrato de prata como sal metálico e leveduras, bactérias, células de mamíferos, aminoácidos ou extratos de plantas como agentes redutores.

Células

Bactérias e leveduras são cultivadas em meio apropriado para cada linhagem celular durante 24 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ em agitador rotativo (120 rpm). O meio de cultura contendo as células é centrifugado a 120 g e todo o sobrenadante é descartado, restando apenas as células, as quais são lavadas com água ultrapura para remover quaisquer componentes oriundos do meio de cultura. Para a síntese das NPMs, 10^5 a 10^7 células são adicionadas a 100 mL a 1 mL de nitrato de prata 1 mM e incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, sendo todas as soluções mantidas no escuro para evitar reações fotoquímicas. Após esse período, a solução é submetida à centrifugação 120 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, e o sobrenadante contendo as partículas é recolhido. Adicionalmente, o sobrenadante de um lisado das células submetidas à

ultrassonicação por alguns minutos (10 a 30) pode ser escolhido como componente biorredutor em vez do uso das células. Pequenas variações podem ser aplicadas nos protocolos para utilização de células de mamíferos.

Tecidos vegetais

Os tecidos vegetais (10 g a 15 g) são coletados e armazenados em freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento do uso, quando são lavados com detergente Dextran[®] diluído $2.000\times$ em água destilada durante 3 minutos, seguido por três ciclos de enxágue em água destilada. Os tecidos são cortados em pequenos pedaços ($\sim 3\text{ mm}$) com o auxílio de aparato cortante (tesoura ou triturador) e fervidos em 150 mL de água ultrapura por 3 minutos. O extrato é submetido à filtração por gravidade, com papel de filtro Whatman n^o 1, para remover os resíduos de folha, ao abrigo da luz ambiente. O extrato aquoso é imediatamente utilizado para a síntese das NPMs. Para a síntese das NPMs, 50 μL do extrato aquoso filtrado são adicionados a 4.950 μL de solução de nitrato de prata (AgNO_3) 1 mM. As reações entre os componentes do extrato e os íons Ag^+ para Ag^0 são realizadas em béquer de vidro, no escuro, durante 3 a 24 horas em banho-maria de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Biomoléculas

Soluções de biomoléculas ou de suas unidades fundamentais (por exemplo, aminoácidos) também são utilizadas na síntese de NPMs. A síntese ocorre adicionando 100 μL de solução de aminoácido (2 mM a 20 mM) a 100 μL solução de nitrato de prata (AgNO_3) 2 mM. As reações entre o aminoácido (ou alguma outra biomolécula) e os íons Ag^+ para conversão a Ag^0 são realizadas em tubos ou microplacas de polipropileno, protegidas da luz, durante 24 a 72 horas para ocorrer a biorredução. Diversos aminoácidos podem ser utilizados: glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, leucina, isoleucina, asparagina, aspartato, lisina, glutamina, glutamato, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina ou triptofano; assim como qualquer biomolécula hidrossolúvel pode ser avaliada quanto ao potencial de biorredução de íons metálicos.

Considerações gerais e métodos de caracterização das NPMs

As concentrações de agentes redutores e metal podem ser variados de acordo com a fonte biológica, por exemplo, células, biomassa, espécies e

parte de plantas, locais de coleta, sazonalidade, biomoléculas e metabólitos; bem como do íon metálico utilizado (Ag^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} ; os quais podem ser oriundos de cloretos, nitratos, acetatos, sulfatos, citratos, carbonatos, entre outras formas). Além disso, as reações podem ser realizadas variando-se o tempo, temperatura ou pH de reação, assim como o tamanho dos constituintes da amostra quando esta é previamente submetida a membranas filtrantes. Todas essas variações são realizadas no intuito de controlar a taxa de formação ou o tamanho/forma das NPMs. Da mesma forma, são possíveis escalonamentos dos volumes de alguns poucos microlitros até centenas de mililitros ou até mesmo litros. O armazenamento das NPMs é realizado preferencialmente a 4 °C.

As NPMs sintetizadas podem ser caracterizadas quanto aos efeitos cinéticos de formação monitorados espectrofotometricamente; pH; tamanho e forma secos (MFA, MET e MEV); índice de polidispersividade (PdI); potencial Zeta de superfície (microeletroforético) e diâmetro hidrodinâmico (espalhamento de luz dinâmico); condutividade elétrica (condutivímetro); estrutura cristalina (difração de raio X); composição elementar (espectroscopia de energia dispersiva); composição química (FTIR, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massa, ressonância nuclear magnética); atividade biológica (como viabilidade celular e hemólise); entre outras abordagens.

26.10 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS E AGROINDUSTRIAIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

As características dos materiais nanométricos podem impactar diversas áreas e também setores industriais, como químico, farmacêutico, alimentos, agricultura, têxtil, energia, dentre outros. As aplicações de NPMs dependem do tipo de rota de síntese escolhida e principalmente da partícula produzida. Nos últimos anos as NPMs, produzidas por meio de rotas de síntese verde, propulsionam diversos setores no que tange a estratégias de pesquisa, desenvolvimento e inovação com sustentabilidade.

As aplicações das NPMs proporcionam um impacto significativo para a sociedade contemporânea nas áreas de separação magnética e concentração de materiais de interesse; sistemas eletrônicos de armazenamento; sistemas de liberação de moléculas; sensores; embalagens funcionais; têxteis; materiais esportivos, dentre outros. As NPPs, por exemplo, por apresentar ação

antimicrobiana, são utilizadas em embalagens, produtos de uso hospitalar e até mesmo em tecidos. Em geral, NPMs utilizadas no campo de biotecnologia variam em diâmetro entre 5 nm a 500 nm, enquanto aquelas mais utilizadas em aplicações biomédicas variam em diâmetro de 5 nm a 20 nm. As NPMs obtidas por meio de rotas de síntese verde satisfazem essas condições, além de apresentar revestimentos moleculares como agentes estabilizantes ou poder até mesmo ser conjugadas com outras moléculas biológicas que confirmem biocompatibilidade e seletividade e possam ser utilizadas em aplicações biológicas e biomédicas (Tabela 26.5).

Na área da saúde pública, o controle de vetores/patógenos que causam danos à saúde humana é uma necessidade importante. Nesse caso, o uso de NPMs sintetizadas via nanotecnologia verde demonstram um grande potencial para o controle de organismos tais como *Culex quinquefasciatus*, *Culex gelidus*, *Leishmania* sp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*^{80,120,148}. Além disso, o diagnóstico de doenças também pode ser contemplado pelo uso das NPMs como pontos quânticos ou nanobiossensores para detecção de células tumorais, entre outros⁷. Na área ambiental, a estratégia de nanobiorremediação é essencial para a recuperação de regiões comprometidas pela presença de contaminantes. Nesse caso, algas, fungos e plantas são importantes exemplos para esse emprego das NPMs⁹. Outros setores industriais, como por exemplo, o têxtil, também podem utilizar as NPMs para melhorar a qualidade ou adicionar novas propriedades (tecidos superabsorventes ou super-repelentes com propriedades distintas, incluindo a ação antibacteriana)⁵.

Tabela 26.5 Atividades biotecnológicas e biomédicas de nanopartículas metálicas obtidas por rotas de síntese verde

| NANOPARTÍCULA | ATIVIDADE | REFERÊNCIAS |
|---------------|-----------------|--|
| Prata | Acaricida | 4 |
| Prata | Antiangiogênica | 26 |
| Prata | Anticâncer | 51 |
| Prata | Anticoagulante | 55 |
| Prata | Antifúngica | 76, 95, 123, 155 |
| Prata | Antimicrobiana | 11, 27, 31, 47, 50, 64, 65, 79, 80, 81, 95, 112, 113, 121, 122, 123, 129, 132, 138, 139, 143, 152, 157 |
| Prata | Antioxidante | 140 |
| Prata | Antiparasítica | 96 |
| Prata | Larvicida | 120, 153, 154 |
| Ouro | Anticâncer | 156, 158 |

| NANOPARTÍCULA | ATIVIDADE | REFERÊNCIAS |
|---------------|----------------------|-------------|
| Ouro | Anticoagulante | 55 |
| Ouro | Antimicrobiana | 69, 127 |
| Ouro | Biocatalisador | 56 |
| Ouro | Biocompatibilidade | 130 |
| Ouro | Biossensor de vapor | 142 |
| Ouro e Prata | Diagnóstico in vitro | 7, 159-161 |
| Titânio | Antibacteriana | 48 |

26.11 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nanopartículas têm despertado fascínio desde muito antes do advento da nanotecnologia, ocorrido há não muito mais do que 20 a 30 anos. De fato, pigmentos utilizados há milhares de anos em grafismos rupestres foram elaborados à base de óxidos de ferro misturados a extratos ou óleos/gorduras de origem animal e vegetal, os quais em suma poderiam ser denominados atualmente de rotas de síntese verde de NPMs. Nesse contexto, o reconhecimento de que os organismos biológicos, sejam eles procariontes ou eucariontes, são importantes fontes biológicas que podem contribuir para a inovação biotecnológica via nanotecnologia verde, não é um fenômeno recente, mas sim uma reinovação tecnológica com repercussões ainda imprevisíveis.

Apesar de relatos científicos sobre os diversos tipos de nanopartículas serem bastante recentes, esta é uma área da nanotecnologia que vem experimentando crescente evolução (Figura 26.3). Após observação dos relatos encontrados na literatura científica e tecnológica sobre síntese verde, é evidente que os organismos biológicos estão sendo explorados com sucesso para a síntese de nanopartículas a partir de metais, de forma rápida e a taxas comparáveis às sínteses com compostos químicos clássicos. Porém, um desafio atual e essencial é de que o mecanismo de redução e estabilização para cada nova rota de síntese seja conhecido e caracterizado, no intuito de aperfeiçoar a reação de síntese e também minimizar o empirismo atual na escolha de novos componentes biológicos como agentes redutores. Além disso, uma preocupação e desafio atuais é a elaboração das rotas para a degradação ou dissolução das NPMs formadas, em uma área que busca a

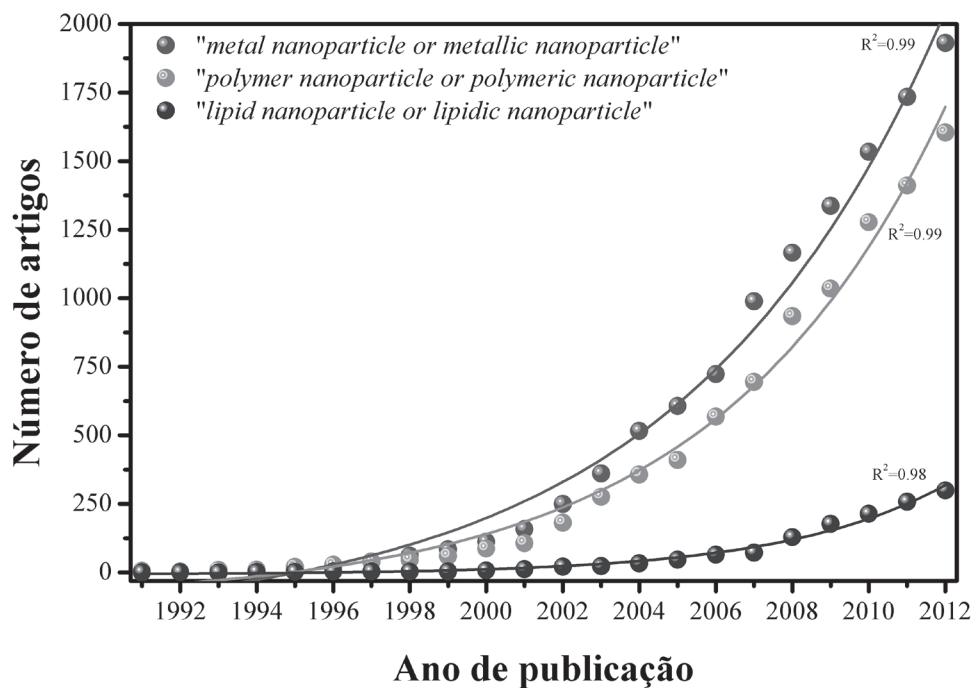


Figura 26.3 Número de artigos publicados sobre os diferentes tipos de nanopartículas (metálicas, poliméricas ou lipídicas), de acordo com a base de dados do ISI Web of Science. Os termos de busca foram utilizados em língua inglesa.

mitigação dos potenciais riscos associados a essa tecnologia, de modo que se possa rotular a nanotecnologia verde como sustentável.

REFERÊNCIAS

1. Zhang L, Pornpattananankul D, Hu CMJ, Huang CM. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17(6):585-94.
2. Rai M, Ingle A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;94(2):287-93.
3. Jabir NR, Tabrez S, Ashraf GM, Shakil S, Damanhour GA, Kamal MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:4391-408.
4. Jayaseelan C, Rahuman AA. Acaricidal efficacy of synthesized silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Ocimum canum* against *Hyalomma anatolicum* and *Hyalomma marginatum isaaci* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 2012;111(3):1369-78.
5. Fahmy TYA, Mobarak F. Green nanotechnology: A short cut to beneficiation of natural fibers. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011;48(1):134-6.
6. Nath D, Banerjee P. Green nanotechnology – A new hope for medical biology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013;36(3):997-1014.
7. Mittal AK, Bhaumik J, Kumar S, Banerjee UC. Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2014;415(0):39-47.
8. Zhang YX, Zheng J, Gao G, Kong YF, Zhi X, Wang K, Zhang XQ, Cui DX. Biosynthesis of gold nanoparticles using chloroplasts. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:2899-906.
9. Narayanan KB, Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011;169(2):59-79.
10. Shukla VK, Yadav RS, Yadav P, Pandey AC. Green synthesis of nanosilver as a sensor for detection of hydrogen peroxide in water. *Journal of Hazardous Materials*. 2012;213:161-6.
11. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009;145(1-2):83-96.
12. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 2010;6(2):257-62.
13. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*. 2013;31(2):346-56.
14. Faramarzi MA, Sadighi A. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2013;189:1-20.

15. Lloyd JR, Byrne JM, Coker VS. Biotechnological synthesis of functional nanomaterials. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011;22(4):509-15.
16. Sinha S, Pan I, Chanda P, Sen SK. Nanoparticles fabrication using ambient biological resources. *Journal of Applied Biosciences*. 2009;19:1113-30.
17. Gericke M, Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*. 2006;83(1-4):132-40.
18. Philip D. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;73(2):374-81.
19. Chauhan A, Zubair S, Tufail S, Sherwani A, Sajid M, Raman SC, Azam A, Owais M. Fungus-mediated biological synthesis of gold nanoparticles: potential in detection of liver cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:2305-19.
20. Baker S, Rakshith D, Kavitha KS, Santosh P, Kavitha HU, Rao Y, Satish S. Plants: Emerging as Nanofactories towards Facile Route in Synthesis of Nanoparticles. *Bioimpacts*. 2013;3(3):111-7.
21. Mata YN, Torres E, Blazquez ML, Ballester A, Gonzalez F, Munoz JA. Gold(III) biosorption and bioreduction with the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;166(2-3):612-8.
22. Nadkarni VD, Pervin A, Linhardt RJ. Directional immobilization of heparin onto beaded supports. *Analytical Biochemistry*. 1994;222(1):59-67.
23. Kemp MM, Kumar A, Mousa S, Park T-J, Ajayan P, Kubotera N, Mousa SA, Linhardt RJ. Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Stabilized with Glycosaminoglycans Having Distinctive Biological Activities. *Biomacromolecules*. 2009;10(3):589-95.
24. Park Y, Hong YN, Weyers A, Kim YS, Linhardt RJ. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. *Iet Nanobiotechnology*. 2011;5(3):69-78.
25. Doughty MJ, Glavin S. Efficacy of different dry eye treatments with artificial tears or ocular lubricants: a systematic review. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 2009;29(6):573-83.
26. Kemp MM, Kumar A, Mousa S, Dyskin E, Yalcin M, Ajayan P, Linhardt RJ, Mousa SA. Gold and silver nanoparticles conjugated with heparin derivative possess anti-angiogenesis properties. *Nanotechnology*. 2009;20(45).
27. Kemp MM, Kumar A, Clement D, Ajayan P, Mousa S, Linhardt RJ. Hyaluronan- and heparin-reduced silver nanoparticles with antimicrobial properties. *Nanomedicine*. 2009;4(4):421-9.
28. Huang HZ, Yang XR. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydrate Research*. 2004;339(15):2627-31.
29. Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*. 1999;20(2):175-82.

30. Joshi JM, Sinha VK. Ceric ammonium nitrate induced grafting of polyacrylamide onto carboxymethyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2007;67(3):427-35.
31. Venkatesham M, Ayodhya D, Madhusudhan A, Babu NV, Veerabhadram G. A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*. 2012:1-7.
32. Goswami N, Saha R, Pal SK. Protein-assisted synthesis route of metal nanoparticles: exploration of key chemistry of the biomolecule. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(10):5485-95.
33. Tan YN, Lee JY, Wang DIC. Uncovering the Design Rules for Peptide Synthesis of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(16):5677-86.
34. Galloway JM, Staniland SS. Protein and peptide biotemplated metal and metal oxide nanoparticles and their patterning onto surfaces. *Journal of Materials Chemistry*. 2012;22(25):12423-34.
35. Shao Y, Jin YD, Dong SJ. Synthesis of gold nanoplates by aspartate reduction of gold chloride. *Chemical Communications*. 2004;(9):1104-5.
36. Daima HK, Selvakannan P, Bhargava SK, Bansal V. Threonine amino acid mediated photochemical synthesis of Au, Ag and Bimetallic Au-Ag nanoparticles with antibacterial activity. *Chemeca 2011: Engineering a Better World*. Sydney, Australia; 2011. p. 365.
37. Ho J-aA, Chang H-C, Su W-T. DOPA-Mediated Reduction Allows the Facile Synthesis of Fluorescent Gold Nanoclusters for Use as Sensing Probes for Ferric Ions. *Analytical Chemistry*. 2012;84(7):3246-53.
38. Wang Z, Zhu H, Wang X, Yang F, Yang X. One-pot green synthesis of biocompatible arginine-stabilized magnetic nanoparticles. *Nanotechnology*. 2009;20(46).
39. Dickerson MB, Sandhage KH, Naik RR. Protein- and Peptide-Directed Syntheses of Inorganic Materials. *Chemical Reviews*. 2008;108(11):4935-78.
40. Berti L, Burley GA. Nucleic acid and nucleotide-mediated synthesis of inorganic nanoparticles. *Nat Nanotechnol*. 2008;3(2):81-7.
41. Yin Y, Alivisatos AP. Colloidal nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface. *Nature*. 2005;437(7059):664-70.
42. Wang Z, Zhang J, Ekman JM, Kenis PJA, Lu Y. DNA-Mediated Control of Metal Nanoparticle Shape: One-Pot Synthesis and Cellular Uptake of Highly Stable and Functional Gold Nanoflowers. *Nano Letters*. 2010;10(5):1886-91.
43. Gugliotti LA, Feldheim DL, Eaton BE. RNA-mediated metal-metal bond formation in the synthesis of hexagonal palladium nanoparticles. *Science*. 2004;304(5672):850-2.
44. Tyagi H, Kushwaha A, Kumar A, Aslam M. pH-dependent synthesis of stabilized gold nanoparticles using ascorbic acid. *International Journal of Nanoscience*. 2011;10(04n05):857-60.

45. Nadagouda MN, Varma RS. Green and controlled synthesis of gold and platinum nanomaterials using vitamin B-2: density-assisted self-assembly of nanospheres, wires and rods. *Green Chemistry*. 2006;8(6):516-8.
46. Nadagouda MN, Varma RS. Green synthesis of Ag and Pd nanospheres, nanowires, and nanorods using vitamin B(2): Catalytic polymerisation of aniline and pyrrole. *Journal of Nanomaterials*. 2008.
47. Zhou W, Zhang Y, Ding X, Liu Y, Shen F, Zhang X, Deng S, Xiao H, Yang G, Peng H. Magnetotactic bacteria: promising biosorbents for heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;95(5):1097-104.
48. Cai F, Li J, Sun J, Ji Y. Biosynthesis of gold nanoparticles by biosorption using *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Chemical Engineering Journal*. 2011;175:70-5.
49. Tanaka M, Arakaki A, Staniland SS, Matsunaga T. Simultaneously Discrete Biomineralization of Magnetite and Tellurium Nanocrystals in Magnetotactic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(16):5526-32.
50. Singh R, Wagh P, Wadhwani S, Gaidhani S, Kumbhar A, Bellare J, Chopade BA. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International Journal of Nanomedicine*. 2013;8:4277-89.
51. Jayaseelan C, Rahuman AA, Roopan SM, Kirthi AV, Venkatesan J, Kim S-K, Iyappan M, Siva C. Biological approach to synthesize TiO₂ nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013;107:82-9.
52. Brayner R, Yepremian C, Djediat C, Coradin T, Herbst F, Livage J, Fievet F, Coute A. Photosynthetic Microorganism-Mediated Synthesis of Akaganeite (β -FeOOH) Nanorods. *Langmuir*. 2009;25(17):10062-7.
53. Wei X, Luo M, Li W, Yang L, Liang X, Xu L, Kong P, Liu H. Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO₃. *Bioresource Technology*. 2012;103(1):273-8.
54. Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Jeyaraj M, Kim J-H. Cytotoxicity of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *Biomed Research International*. 2013.
55. Pugazhenthiran N, Anandan S, Kathiravan G, Prakash NKU, Crawford S, Ashokkumar M. Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. *Journal of Nanoparticle Research*. 2009;11(7):1811-5.
56. Zhang H, Yu X, Guo D, Qu B, Zhang M, Li Q, Wang T. Synthesis of Bacteria Promoted Reduced Graphene Oxide-Nickel Sulfide Networks for Advanced Supercapacitors. *Acs Applied Materials & Interfaces*. 2013;5(15):7335-40.

57. Pandian SRK, Deepak V, Kalishwaralal K, Gurunathan S. Biologically synthesized fluorescent CdS NPs encapsulated by PHB. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011;48(4-5):319-25.
58. Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian SRK, Kottaisamy M, BarathManiKanth S, Kartikeyan B, Gurunathan S. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;77(2):257-62.
59. Srivastava SK, Yamada R, Ogino C, Kondo A. Biogenic synthesis and characterization of gold nanoparticles by *Escherichia coli* K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol. *Nanoscale Research Letters*. 2013;8.
60. Monras JP, Diaz V, Bravo D, Montes RA, Chasteen TG, Osorio-Roman IO, Vasquez CC, Perez-Donoso JM. Enhanced Glutathione Content Allows the In Vivo Synthesis of Fluorescent CdTe Nanoparticles by *Escherichia coli*. *Plos One*. 2012;7(11).
61. Correa-Llanten DN, Munoz-Ibacache SA, Castro ME, Munoz PA, Blamey JM. Gold nanoparticles synthesized by *Geobacillus* sp strain ID17 a thermophilic bacterium isolated from Deception Island, Antarctica. *Microbial Cell Factories*. 2013;12.
62. Tuo Y, Liu G, Zhou J, Wang A, Wang J, Jin R, Lv H. Microbial formation of palladium nanoparticles by *Geobacter sulfurreducens* for chromate reduction. *Bioresource Technology*. 2013;133:606-11.
63. Srivastava S, Constanti M. Room temperature biogenic synthesis of multiple nanoparticles (Ag, Pd, Fe, Rh, Ni, Ru, Pt, Co, and Li) by *Pseudomonas aeruginosa* SM1. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012;14(4):1-10.
64. Varshney R, Bhadauria S, Gaur MS, Pasricha R. Characterization of Copper Nanoparticles Synthesized by a Novel Microbiological Method. *Jom*. 2010;62(12):102-4.
65. Oves M, Khan MS, Zaidi A, Ahmed AS, Ahmed F, Ahmad E, Sherwani A, Owais M, Azam A. Antibacterial and Cytotoxic Efficacy of Extracellular Silver Nanoparticles Biofabricated from Chromium Reducing Novel OS4 Strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Plos One*. 2013;8(3).
66. Prakasham RS, Kumar BS, Kumar YS, Shankar GG. Characterization of Silver Nanoparticles Synthesized by Using Marine Isolate *Streptomyces albidoflavus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012;22(5):614-21.
67. Manikprabhu D, Lingappa K. Microwave Assisted Rapid and Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using a Pigment Produced by *Streptomyces coelicolor* klmp33. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2013.
68. Deplanche K, Macaskie LE. Biorecovery of gold by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008;99(5):1055-64.
69. Sawosz E, Chwalibog A, Szeliga J, Sawosz F, Grodzik M, Rupiewicz M, Niemiec T, Kacprzyk K. Visualization of gold and platinum nanoparticles interacting with *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Nanomedicine*. 2010;5:631-7.

70. Asmathunisha N, Kathiresan K. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;103:283-7.
71. Stengel DB, Connan S, Popper ZA. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*. 2011;29(5):483-501.
72. Barwal I, Ranjan P, Kateriya S, Yadav SC. Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011;9.
73. Mohseniazar M, Barin M, Zarredar H, Alizadeh S, Shanehbandi D. Potential of microalgae and lactobacilli in biosynthesis of silver nanoparticles. *Bioimpacts*. 2011;1(3):149-52.
74. Lirdprapamongkol K, Warisnoicharoen W, Soisuwan S, Svasti J. Eco-friendly synthesis of fucoidan-stabilized gold nanoparticles. *American Journal of Applied Sciences*. 2010;7(8):1038.
75. Schroefel A, Kratosova G, Bohunicka M, Dobrocka E, Vavra I. Biosynthesis of gold nanoparticles using diatoms-silica-gold and EPS-gold bionanocomposite formation. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(8):3207-16.
76. Vivek M, Kumar PS, Steffi S, Sudha S. Biogenic silver nanoparticles by *Gelidiella acerosa* extract and their antifungal effects. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2011;3(3):143.
77. Singaravelu G, Arockiamary JS, Kumar VG, Govindaraju K. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007;57(1):97-101.
78. Mahdavi M, Namvar F, Ahmad M, Mohamad R. Green Biosynthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Using Seaweed (*Sargassum muticum*) Aqueous Extract. *Molecules*. 2013;18(5):5954-64.
79. Rajesh S, Raja DP, Rath J, Sahayaraj K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ulva fasciata* (Delile) ethyl acetate extract and its activity against *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Journal of Biopesticides*. 2012;5(119):2012.
80. Govindaraju K, Kiruthiga V, Kumar VG, Singaravelu G. Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles by a Marine Alga, *Sargassum wightii* Grevilli and Their Antibacterial Effects. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2009;9(9):5497-501.
81. El-Rafie HM, El-Rafie MH, Zahran MK. Green synthesis of silver nanoparticles using polysaccharides extracted from marine macro algae. *Carbohydrate Polymers*. 2013;96(2):403-10.
82. Kaminskyj S, Jilkine K, Szeghalmi A, Gough K. High spatial resolution analysis of fungal cell biochemistry – bridging the analytical gap using synchrotron FTIR spectromicroscopy. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;284(1):1-8.

83. Kowshik M, Deshmukh N, Vogel W, Urban J, Kulkarni S, Paknikar K. Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002;78(5):583-8.
84. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, Sastry M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003;28(4):313-8.
85. Bhainsa KC, D'Souza SF. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006;47(2):160-4.
86. Kashyap PL, Kumar S, Srivastava AK, Sharma AK. Myconanotechnology in agriculture: a perspective. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2013;29(2):191-207.
87. Dameron C, Reese R, Mehra R, Kortan A, Carroll P, Steigerwald M, Brus L, Winge D. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature*. 1989;338:596-7.
88. Kowshik M, Ashtaputre S, Kharrazi S, Vogel W, Urban J, Kulkarni SK, Paknikar KM. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology*. 2003;14(1):95-100.
89. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2010;156(1-2):1-13.
90. Jha AK, Prasad K, Prasad K. A green low-cost biosynthesis of Sb₂O₃ nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;43(3):303-6.
91. Agnihotri M, Joshi S, Kumar AR, Zinjarde S, Kulkarni S. Biosynthesis of gold nanoparticles by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Materials Letters*. 2009;63(15):1231-4.
92. Mirzadeh S, Darezereshki E, Bakhtiari F, Fazelipour MH, Hosseini MR. Characterization of zinc sulfide (ZnS) nanoparticles Biosynthesized by *Fusarium oxysporum*. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 2013;16(2):374-8.
93. Bansal V, Rautaray D, Bharde A, Ahire K, Sanyal A, Ahmad A, Sastry M. Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles. *Journal of Materials Chemistry*. 2005;15(26):2583-9.
94. Riddin TL, Gericke M, Whiteley CG. Analysis of the inter- and extracellular formation of platinum nanoparticles by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using response surface methodology. *Nanotechnology* 2006;17(14):3482-9.
95. Al-Askar A, Hafez E, Kabeil S, Meghad A. Bioproduction of silver-nano particles by *Fusarium oxysporum* and their antimicrobial activity against some plant pathogenic bacteria and fungi. *Life Science Journal*. 2013;10(3):2470-6.
96. Gherbawy Y, Shalaby I, El-sadek M, Elhariry H, Banaja A: The Anti-Fasciolasis Properties of Silver Nanoparticles Produced by *Trichoderma harzianum* and Their

Improvement of the Anti-Fasciolosis Drug Triclabendazole. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(11):21887-98.

97. Sanghi R, Verma P: Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresource Technology*. 2009;100(1):501-4.

98. Duran N, Marcato PD, Duran M, Yadav A, Gade A, Rai M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;90(5):1609-24.

99. Durán N, Marcato PD, Alves OL, De Souza GI, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*. 2005;3(8):1-7.

100. Walker GM. *Yeast Physiology and Biotechnology*. New York: Wiley; 1998. 362p.

101. Lin L, Wu W, Huang J, Sun D, Waithera NuM, Zhou Y, Wang H, Li Q. Catalytic gold nanoparticles immobilized on yeast: From biosorption to bioreduction. *Chemical Engineering Journal*. 2013;225:857-64.

102. Breierova E, Vajczikova I, Sasinkova V, Stratilova E, Fisera I, Gregor T, Sajbidor J. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2002;57(7-8):634-9.

103. Gade A, Ingle A, Whiteley C, Rai M. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. *Biotechnology Letters*. 2010;32(5):593-600.

104. Krumov N, Perner-Nochta I, Oder S, Gotchev V, Angelov A, Posten C. Production of Inorganic Nanoparticles by Microorganisms. *Chemical Engineering & Technology*. 2009;32(7):1026-35.

105. Kumari A, Kumar V, Yadav SK. Plant Extract Synthesized PLA Nanoparticles for Controlled and Sustained Release of Quercetin: A Green Approach. *Plos One*. 2012;7(7).

106. Akhtar MS, Panwar J, Yun Y-S. Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2013;1(6):591-602.

107. Kumar V, Yadav SK. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2009;84(2):151-7.

108. Gardea-Torresdey JL, Tiemann KJ, Parsons JG, Gamez G, Yacamán MJ. Characterization of trace level Au(III) binding to alfalfa biomass (*Medicago sativa*) by GFAAS. *Advances in Environmental Research*. 2002;6(3):313-23.

109. Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. *Biotechnology Progress*. 2006;22(2):577-83.

110. Shukla R, Nune SK, Chanda N, Katti K, Mekapothula S, Kulkarni RR, Welshons WV, Kannan R, Katti KV. Soybeans as a phytochemical reservoir for the production and stabilization of biocompatible gold nanoparticles. *Small*. 2008;4(9):1425-36.

111. Nune SK, Chanda N, Shukla R, Katti K, Kulkarni RR, Thilakavathy S, Mekapothula S, Kannan R, Katti KV. Green nanotechnology from tea: phytochemicals in tea as

building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*. 2009;19(19):2912-20.

112. Das J, Das MP, Velusamy P. *Sesbania grandiflora* leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013;104:265-70.

113. Patil RS, Kokate MR, Kolekar SS. Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using *Ocimum tenuiflorum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012;91:234-8.

114. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, Fatma A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;81(1):81-6.

115. Maensiri S, Laokul P, Klinkaewnarong J, Phokha S, Promarak V, Seraphin S. Indium oxide (In₂O₃) nanoparticles using *Aloe vera* plant extract: Synthesis and optical properties. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. 2008;10(3):161-5.

116. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;76(1):50-6.

117. Quelemes PV, Araruna FB, de Faria BEE, Kuckelhaus SAS, da Silva DA, Mendonca RZ, Eiras C, Soares MJdS, Leite JRSA. Development and Antibacterial Activity of Cashew Gum-Based Silver Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(3):4969-81.

118. Shameli K, Bin Ahmad M, Jaffar Al-Mulla EA, Ibrahim NA, Shabanzadeh P, Rustaiyan A, Abdollahi Y, Bagheri S, Abdolmohammadi S, Usman MS, Zidan M. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Callicarpa maingayi* stem bark extraction. *Molecules*. 2012;17(7):8506-17.

119. Li S, Shen Y, Xie A, Yu X, Qiu L, Zhang L, Zhang Q. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chemistry*. 2007;9(8):852.

120. Yang X, Li Q, Wang H, Huang J, Lin L, Wang W, Sun D, Su Y, Opiyo JB, Hong L, Wang Y, He N, Jia L. Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of *Cinnamomum camphora* leaf. *Journal of Nanoparticle Research*. 2009;12(5):1589-98.

121. Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, Wang H, Wang Y, Shao W, He N, Hong J, Chen C. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*. 2007;18(10):105104.

122. Smitha SL, Philip D, Gopchandran KG. Green synthesis of gold nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* leaf broth. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;74(3):735-9.

123. Sathishkumar M, Sneha K, Won SW, Cho CW, Kim S, Yun YS. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;73(2):332-8.
124. Babu PJ, Das RK, Kumar A, Bora U. Microwave-mediated synthesis of gold nanoparticles using coconut water. *International Journal of Green Nanotechnology*. 2011;3(1):13-21.
125. Narayanan KB, Sakthivel N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. *Materials Letters*. 2008;62(30):4588-90.
126. Sneha K, Sathishkumar M, Lee SY, Bae MA, Yun Y-S. Biosynthesis of Au nanoparticles using cumin seed powder extract. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2011;11(2):1811-4.
127. Song JY, Kwon EY, Kim BS. Biological synthesis of platinum nanoparticles using Diopyros kaki leaf extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2010;33(1):159-64.
128. Jia L, Zhang Q, Li Q, Song H. The biosynthesis of palladium nanoparticles by antioxidants in *Gardenia jasminoides* Ellis: long lifetime nanocatalysts for p-nitrotoluene hydrogenation. *Nanotechnology*. 2009;20(38):385601.
129. Kumar PR. Soybean (*Glycine max*) Leaf Extract Based Green Synthesis of Palladium Nanoparticles. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2012;03(01):14-9.
130. Liny P, Divya T, Malakar B, Nagaraj B, Krishnamurthy N, Dinesh R. Preparation of gold nanoparticles from *Helianthus annuus* (sun flower) flowers and evaluation of their antimicrobial activities. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*. 2012;3(1).
131. Lukman AI, Gong B, Marjo CE, Roessner U, Harris AT. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011;353(2):433-4.
132. MubarakAli D, Thajuddin N, Jeganathan K, Gunasekaran M. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;85(2):360-5.
133. Das RK, Gogoi N, Bora U. Green synthesis of gold nanoparticles using *Nyctanthes arbortristis* flower extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2011;34(5):615-9.
134. Vijayaraghavan K, Nalini S, Prakash NU, Madhankumar D. One step green synthesis of silver nano/microparticles using extracts of *Trachyspermum ammi* and *Papaver somniferum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012;94:114-7.
135. Raja K, Saravanakumar A, Vijayakumar R. Efficient synthesis of silver nanoparticles from *Prosopis juliflora* leaf extract and its antimicrobial activity using sewage. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012;97:490-4.
136. Mittal AK, Kaler A, Banerjee UC. Free radical scavenging and antioxidant activity of silver nanoparticles synthesized from flower extract of *Rhododendron dauricum*. *Nano Biomedicine and Engineering*. 2012;4(3):118-24.

137. Dubey SP, Lahtinen M, Sarkka H, Sillanpaa M. Bioprospective of *Sorbus aucuparia* leaf extract in development of silver and gold nanocolloids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;80(1):26-33.
138. Ankamwar B, Chaudhary M, Sastry M. Gold nanotriangles biologically synthesized using tamarind leaf extract and potential application in vapor sensing. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*. 2005;35(1):19-26.
139. Ajitha B, Ashok Kumar Reddy Y, Reddy PS. Biogenic nano-scale silver particles by *Tephrosia purpurea* leaf extract and their inborn antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013;121C:164-72.
140. Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2009;32(1):79-84.
141. Velayutham K, Rahuman AA, Rajakumar G, Roopan SM, Elango G, Kamaraj C, Marimuthu S, Santhoshkumar T, Iyappan M, Siva C. Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using bark aqueous extract of *Ficus racemosa* against *Culex quinquefasciatus* and *Culex gelidus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2013;6(2):95-101.
142. Gnanadesigan M, Anand M, Ravikumar S, Maruthupandy M, Ali MS, Vijayakumar V, Kumaraguru A. Antibacterial potential of biosynthesised silver nanoparticles using *Avicennia marina* mangrove plant. *Applied Nanoscience*. 2012;2(2):143-7.
143. Savithramma N, Rao ML, Rukmini K, Suvarnalatha P. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. *International Journal of ChemTech Research*. 2011;3(3):1394-402.
144. Anshup, Venkataraman JS, Subramaniam C, Kumar RR, Priya S, Kumar TRS, Omkumar RV, John A, Pradeep T. Growth of gold nanoparticles in human cells. *Langmuir*. 2005;21(25):11562-7.
145. Douglas T, Strable E, Willits D, Aitouchen A, Libera M, Young M. Protein engineering of a viral cage for constrained nanomaterials synthesis. *Advanced Materials*. 2002;14(6):415-+.
146. Shenton W, Douglas T, Young M, Stubbs G, Mann S. Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus. *Advanced Materials*. 1999;11(3):253-+.
147. Lee SW, Mao CB, Flynn CE, Belcher AM. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science*. 2002;296(5569):892-5.
148. Ramezani F, Jebali A, Kazemi B. A Green Approach for Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles by *Leishmania* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012;168(6):1549-55.
149. Jain N, Bhargava A, Tarafdar JC, Singh SK, Panwar J. A biomimetic approach towards synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(2):859-69.

150. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*. 2011;13(10):2638.
151. Ingale AG, Chaudhari AN. Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An Eco- Friendly Approach. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 2013;04(02).
152. Krishnaraj C, Ramachandran R, Mohan K, Kalaichelvan PT. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012;93:95-9.
153. Prabakar K, Sivalingam P, Rabeek SIM, Muthuselvam M, Devarajan N, Arjunan A, Karthick R, Suresh MM, Wembonyama JP. Evaluation of antibacterial efficacy of phyto fabricated silver nanoparticles using *Mukia scabrella* (*Musumusukkai*) against drug resistance nosocomial gram negative bacterial pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;104:282-8.
154. Santhoshkumar T, Rahuman AA, Rajakumar G, Marimuthu S, Bagavan A, Jayaseelan C, Zahir AA, Elango G, Kamaraj C. Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors. *Parasitology Research*. 2011;108(3):693-702.
155. Suganya A, Murugan K, Kovendan K, Kumar PM, Hwang J-S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Murraya koenigii* leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*. 2013;112(4):1385-97.
156. Raghunandan D, Ravishankar B, Sharanbasava G, Mahesh DB, Harsoor V, Yalagatti MS, Bhagawanraju M, Venkataraman A. Anti-cancer studies of noble metal nanoparticles synthesized using different plant extracts. *Cancer Nanotechnology*. 2011;2(1-6):57-65.
157. Prasad T, Elumalai E. Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011;1(6):439-42.
158. Subramanian V, Suja S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Coleus amboinicus* lour, antioxidant activity and invitro cytotoxicity against Ehrlich's Ascite carcinoma. *Journal of Pharmacy Research*. 2012;5(2).
159. Chen X-J, Sanchez-Gaytan BL, Qian Z, Park S-J. Noble metal nanoparticles in DNA detection and delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2012;4(3):273-90.
160. Doria G, Conde J, Veigas B, Giestas L, Almeida C, Assunção M, Rosa J, Baptista PV. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors*. 2012;12(2):1657-87.
161. Youns M, Hoheisel JD, Efferth T. Therapeutic and Diagnostic Applications of Nanoparticles. *Current Drug Targets*. 2011;12(3):357-65.

GESTÃO ESTRATÉGICA EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Rodrigo R. Resende

27.1 INTRODUÇÃO

Para uma definição mais abrangente sobre “países emergentes”, pode-se dizer que são aqueles países cujas economias partiram de um estágio de estagnação ou subdesenvolvimento e se encontram em pleno desenvolvimento econômico. São também chamados de “países em desenvolvimento”. Abaixo apresento as principais características que os países emergentes possuem*:

- Padrão de vida de grande parte da população entre os níveis baixo e médio.
- Índice de desenvolvimento humano (IDH) entre os níveis médio e alto.
- Renda *per capita* (produto interno bruto – PIB – *per capita*) anual entre 5 e 8 mil dólares.
- Setor industrial em desenvolvimento.

* Vale dizer que um país não precisa apresentar todas as características da lista para ser considerado emergente, mas boa parte delas.

- Crescimento da infraestrutura (portos, rodovias, aeroportos, ferrovias etc.).
- Atração de capital externo para investimentos nos setor produtivo.
- Aumento da instalação de filiais de grandes empresas multinacionais.
- Crescimento positivo na geração de empregos.
- Taxas elevadas de formação de capital.
- Mudanças significativas e positivas na estrutura social e econômica da população; diminuição da pobreza e aumento da classe média baixa.
- Existência de processo de êxodo rural (migração do campo para os centros urbanos).

As diferenças entre países desenvolvidos e emergentes são inúmeras – desde a qualidade e o padrão de hospitais e escolas públicas até a infraestrutura logística dos meios de transporte, passando por diversas outras questões. Obviamente, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento há pessoas que desrespeitam leis (se não fosse assim, punições não seriam necessárias) e não têm bom senso suficiente para viver em uma sociedade na qual a cidadania não é colocada em prática e os cidadãos têm poucos direitos de participar da vida política.

Noto, talvez de modo falho, um contraste entre o mundo desenvolvido (cujos cidadãos compartilham do interesse no desenvolvimento enquanto nação) e o mundo em que a cultura do “tirar vantagem” (em serviços públicos e privados, não só nos países em desenvolvimento) é vista como inteligência, “esperteza”.

É justamente a diferença entre nação e país que pode transformar uma sociedade marginalizada, e por marginal aqui me refiro àqueles que estão fora do topo da pirâmide da renda *per capita*, em uma sociedade cuja renda é suficiente para fornecer à população todas as condições necessárias a uma mínima qualidade de vida, desde educação básica até atendimento na primeira hora em um hospital público. Sim, os países em desenvolvimento também têm hospitais e educação de qualidade, mas não vejo a hora de melhorar e chegarmos a sermos um país de primeiro mundo, o que na minha opinião, estamos cada vez mais distantes. Nota-se, entretanto, que a perspectiva de qualidade boa ou ruim é dada com parâmetros pessoais de cada um. Se tivermos a Universidade de Harvard ou o Instituto de Tecnologia de Massachusetts (Massachusetts Institute of Technology, M.I.T.) como parâmetro, veremos que a qualidade dos países subdesenvolvidos arrasta-se aos pés daquelas. Não pelas mentes de nossos cientistas, mas pela falta de infraestrutura e investimentos que veremos a seguir.

As informações aqui apresentadas constituem uma revisão não muito apurada, justamente para demonstrar que, com pouco esforço e vontade, um Brasil melhor pode ser construído. Cinco pontos foram selecionados para se traçar o caminho para uma nação desenvolvida.

Entre vários estudos avaliados, incluindo aquele do próprio governo (daí não se sabe por que não seguiu suas próprias ideias), todos se destacaram pelo poder comum de síntese^{1,2,3}. A maior fonte de crescimento econômico é um nível elevado e sustentado de investimento. No que se refere a “investimento”, deve-se levar em conta que este não deve ser considerado no sentido estrito da palavra, mas sim no seu sentido mais amplo, incluindo os recursos humanos (educação de qualidade e aprovada, treinamento e capacitação para a realização de tarefas para as quais há demanda), em inovação tecnológica e organizacional (desde tecnologia de base e avançada até uma estrutura menos burocratizada e mais eficiente), assim como em áreas como as de maquinário e infraestrutura (automatização e transportes mais rápidos e baratos).

Os dados relativos às nações desenvolvidas também sugerem que a abertura comercial e a competição formam o melhor ambiente ao desenvolvimento⁴.

Apresentarei os pontos selecionados, colocando o problema no qual o Brasil se encontra para cada ponto e a solução, tendo como critério os exemplos de nações desenvolvidas e como chegaram até lá.

27.2 ABERTURA COMERCIAL

Problema apresentado pelo Brasil

O potencial de crescimento do Brasil é reduzido pelo fato de ser um dos países mais fechados para o comércio.

Exemplos a serem seguidos

Tigres Asiáticos, como Taiwan.

Solução para o desenvolvimento do Brasil

O processo de globalização, que se intensificou a partir dos anos 1980, beneficiou algumas das principais economias do Sudeste Asiático. Com a redução nas tarifas de importação e o aumento no uso de contêineres, que muito reduziram o custo do transporte marítimo, foi possível às multinacionais distribuir em diferentes regiões do globo o processo de fabricação, usando mão de obra qualificada, mais barata e disponibilidade de recursos naturais disponíveis diretamente no país de fabricação.

A criação de cadeias produtivas globais foi resultado direto dessas mudanças. Atualmente, do total das exportações mundiais, 28% resultam diretamente de produtos e serviços importados, que, após processamento e incorporação a novas linhas de produção, retornam novamente ao mercado exterior.

Cada cadeia produtiva local especializou-se em nichos específicos de atuação. Taiwan é um exemplo nas áreas de computação e telecomunicações e apresentou um resultado em suas vendas externas que soma em torno de 300 bilhões de dólares, 25% a mais do que as brasileiras. Seu exemplo mostra que para aumentar as exportações foi preciso elevar as importações.

Tomando as exportações da Coreia do Sul como exemplo, temos a impressionante marca de mais de 60% ligados a cadeias internacionais, quase o dobro do percentual do Brasil. Nos censos de 2013-2015 do capital estrangeiro, as empresas brasileiras conectadas às cadeias produtivas globais apresentaram resultados de exportação maiores, foram mais produtivas e suas participações no aumento do PIB nacional foram mais proeminentes do que os das demais. De acordo com o estudo Cadeias Globais e Desenvolvimento, publicado pela Conferência das Nações Unidas para o Comércio e Desenvolvimento (United Nations Conference on Trade and Development – UNCTad), existe uma clara correlação entre o crescimento econômico de nações e suas participações nesses sistemas de produção internacionais⁵.

Desde os últimos anos da década de 90, as nações que integraram cadeias produtivas globais tiveram uma taxa de elevação do PIB *per capita* cerca de dois pontos percentuais acima da média. O crescimento do PIB de um país emergente tem que, necessariamente, ser muito mais atrativo do que os meros 1% a 2% a que atualmente crescemos. As nações mais ricas do mundo, considerando somente as desenvolvidas, têm o crescimento de seu PIB nessa faixa, mas é preciso observar que um país desenvolvido crescer a essas taxas é diferente de um país dito emergente crescer a essas mesmas taxas. Consideremos uma empresa com um faturamento de 100 mil reais

que passa a faturar 110 mil reais, apresentando uma taxa de crescimento de 10%. Agora imaginemos uma empresa com faturamento anual de 1 milhão de reais e outra com faturamento de 10 milhões de reais. Mesmo com um crescimento percentual menor que 10%, em valores brutos elas crescerão bem mais que os 10 mil reais apresentados pela microempresa. O mesmo vale para a economia do Brasil, que tem um PIB em torno de 1,5-2,0 trilhões de dólares. Um acréscimo de 15-20 bilhões de dólares em sua economia representa um crescimento de apenas 1%. Comparando com os Estados Unidos, os mesmos 1% de crescimento representam um acréscimo de cerca de 170 bilhões de dólares. Para sair de um PIB medíocre, é preciso que o Brasil se abra para o comércio⁶.

Além da produção em si, a maneira por meio da qual se dá o processo de produção também é importante. Para comparação, tomemos como exemplo México e Taiwan. Ambos produzem microcomputadores (PCs); porém, os asiáticos fabricam chips e inovam, enquanto o México se restringe à montagem⁷, atuando como mero coadjuvante.

Esse exemplo demonstra claramente que a posição de um país dentro da cadeia produtiva pode colocá-lo em destaque quanto ao seu grau de desenvolvimento. Basta comparar o PIB *per capita* de ambos os países. O do México é de cerca de 9.700 dólares por habitante, enquanto o de Taiwan é mais que o dobro desse valor*.

27.3 INFRAESTRUTURA TECNOLÓGICA

Problema apresentado pelo Brasil

Os serviços de telecomunicações do Brasil são de péssima qualidade e possuem valores abusivos, o que afeta o fluxo de transmissão de dados entre pessoas e empresas.

Exemplo a ser seguido

Coreia do Sul.

* Pesquisa disponível em: <http://pt.knoema.com/atlas/M%C3%A9xico/?compareTo=TW>. Acesso em: 29 mar. 2016. Dados de 2014.

Solução para o desenvolvimento do Brasil

Toda nação que almeja o desenvolvimento tem como base planos de metas a serem atingidos em um determinado prazo. Exceto por aqueles que almejam atingir números negativos, todos os outros traçam planos que possam elevá-los a patamares mais altos do que aquele que ocupavam anteriormente. O governo da Coreia do Sul, no início dos anos 1990, elegeu o setor de tecnologia da informação (TI) como prioridade e definiu a criação de uma rede de banda larga como sua principal meta. Nesse ponto, definir o padrão de qualidade de suas conexões acima do padrão internacional foi crucial para que o país pudesse atingir um patamar superior ao de qualquer outra localidade do planeta. Outra meta traçada pelo governo foi eliminar as barreiras de entrada para novas operadoras de telecomunicação, estimulando a competição por preços mais baixos – a chamada livre concorrência, ponto apresentado anteriormente neste capítulo.

Atualmente, a Coreia do Sul é o país com a maior rede de fibra óptica por habitante. Também é tida como referência nos estudos sobre o impacto da infraestrutura de tecnologia da informação no crescimento econômico, o que pode ser demonstrado pelo seu PIB, cuja expansão de cerca de 20% nos últimos cinco anos está diretamente relacionada ao avanço do setor de TI.

O acesso à informação de maneira rápida e confiável permite um aumento de produtividade tanto pessoal quanto empresarial. O fluxo de informações na era da internet é o que conecta agilidade no processamento de informações e produção de conhecimento.

Segundo relatório de 2009 do Banco Mundial, cada aumento de dez pontos percentuais nas conexões de internet banda larga de um país corresponde a um crescimento adicional de 1,3 ponto percentual no PIB.

Hoje, no Brasil, temos mais de 100 milhões de usuários de banda larga, mesmo considerando que as conexões sejam, em geral, de péssima qualidade e com preços exorbitantes. Em estudos recentes de uma empresa americana de internet, a Akamai, e da Agência Nacional de Telecomunicações (ANATEL), sumarizados pela Teleco*, a velocidade média da banda larga no Brasil é de 4,1 megabits por segundo (Mbps). Certamente, esse valor aumentou com o passar dos anos; o caso é que aumenta menos que a média dos outros países emergentes ou desenvolvidos. A velocidade de conexão média global aumentou 3,5% para 5,1 Mbps, no segundo trimestre de 2015. o que nos coloca na 93ª posição em um *ranking* de 243 países – abaixo da média

* Ver <http://www.teleco.com.br/blarga1.asp>.

mundial, que é de 5,1 Mbps (Tabelas 27.1 a 27.3)⁸. Essa posição vem piorando nos últimos anos (dados até 2016). Em relação aos países da América Latina, de acordo com esse estudo, batizado de *State of the Internet*, o Brasil é o 8º país, ficando atrás de Uruguai (6,7 Mbps), Chile (5,7 Mbps), México (4,9 Mbps), Argentina (4,6 Mbps), Colômbia (4,5 Mbps), Peru (4,5 Mbps) e Equador (4,1 Mbps)⁸.

Tabela 27.1 Estatísticas Gerais da População e Economia Brasileiras como Valores Referenciais

| BRASIL | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| População* | 194.351 | 196.289 | 198.172 | 200.000 | 201.774 | 203.492 | 205.156 |
| PIB R\$ BILHÕES | 3.333 | 3.886 | 4.374 | 4.806 | 5.316 | 5.687 | 5.904 |
| Cresc. Anual | (0,1%) | 7,5% | 3,9% | 1,9% | 3,0% | 0,1% | (3,8%) |
| PIB US\$ Bilhões | 1.673 | 2.210 | 2.613 | 2.459 | 2.461 | 2.416 | 1.769 |
| PIB PER CAPITA R\$ | 17.221 | 19.877 | 22.157 | 24.121 | 26.446 | 28.048 | 28.876 |
| Cresc. Anual | (1,2%) | 6,5% | 2,9% | 1,0% | 2,1% | (0,8%) | (4,6%) |
| PIB per capita US\$ | 8.642 | 11.303 | 13.237 | 12.342 | 12.244 | 11.914 | 8.651 |
| Inflação – IGPM (%) | -1,72 | 11,32 | 5,10 | 7,81 | 5,53 | 2,66 | 10,54 |
| Inflação IPCA (%) | 4,31 | 5,92 | 6,50 | 5,84 | 5,91 | 6,40 | 10,67 |
| Câmbio fechamento (R\$ por US\$) | 1,74 | 1,67 | 1,88 | 2,04 | 2,34 | 2,66 | 3,90 |

* Alteração de acordo com revisão 2013 da população feita pelo IBGE. Valores entre parênteses correspondem a negativos.

Tabela 27.2 Velocidade Média da Banda Larga no Brasil

| KBPS | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Velocidade Média | 863 | 1.025 | 1.388 | 1.704 | 1.803 | 2.331 | 2.700 | 3.000 | 4.100 |

Fonte: Akamai Technologies, Inc⁸

Tabela 27.3 Posição do Brasil em Rankings Mundiais de Tecnologia de Informação e Comunicação

| | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| GCI – WEF | 72 | 64 | 56 | 58 | 53 | 48 | 56 | 57 | 75 |
| NRI | 53 | 59 | 59 | 61 | 56 | 65 | 60 | 69 | 84 |
| IDI UIT | 61 | 64 | 0 | 67 | 62 | 62 | 65 | 61 | 61 |
| GLOBAL INNOVATION INDEX (GII) | 40 | 0 | 50 | 68 | 47 | 58 | 64 | 61 | 70 |

Fonte: World Economic Forum e UIT⁹

Legenda: GCI – WEF = *Global Competitiveness Index – World Economic Forum*; NRI = *Networked Readiness Index*; IDI UIT = *ICT (Information and communication technologies) Development Index (IDI)*. Estes são índices internacionais baseados em acordos multilaterais de tecnologias de informação e comunicação. O Global Innovation Index (GII) tem como objetivo capturar as múltiplas facetas da inovação e fornecer as ferramentas que possam ajudar na adaptação das políticas para promover o crescimento de longo prazo, a melhoria da produtividade e o crescimento do emprego. O GIi ajuda a criar um ambiente no qual os fatores de inovação são continuamente avaliados. Ele fornece uma ferramenta-chave e um rico banco de dados de métricas detalhadas para 141 economias no ano 2015, que representam 95,1% da população mundial e 98,6% do PIB global.

Em relação ao custo da internet, o Brasil possui a segunda internet mais cara do mundo, de acordo com uma pesquisa realizada pela Fundação Getúlio Vargas (FGV). O cálculo, que relaciona o preço médio da banda larga à renda *per capita* da população em 15 países, constatou que o brasileiro precisa trabalhar 5,01 horas por mês para pagar por uma conexão à rede de 1 Mbps. A Argentina está em primeiro lugar no *ranking*: lá esse número é de 5,15 horas mensais.

Segundo a FGV, o preço médio da conexão de 1 Mbps em terras brasileiras é de 25,06 dólares (em março de 2016, aproximadamente 90 reais), e mais de 40% desse valor corresponde a impostos cobrados pelo serviço, enquanto o Japão, que exige apenas 0,015 hora de trabalho por mês, cobra somente 5%¹⁰. Outros países considerados no mesmo patamar que o Brasil, como Chile e Portugal, têm o serviço pago com 2,50 horas e 1 hora, respectivamente, de trabalho^{*10}. Essas horas de trabalho são relacionadas ao dólar; então, se a moeda local se desvaloriza, pior será a colocação do país em análise. Se considerarmos o ano de 2013 no Brasil, em que a média da cotação do dólar eram R\$ 2,15, a situação piorou quando consideramos que esse valor aumenta ainda mais.

* Maiores detalhes podem ser obtidos no site <http://www.cps.fgv.br/cps/telefonica/>.

Além de ter uma das cargas tributárias mais altas do mundo, beirando os 36%, o número de operadoras de internet em funcionamento em um país com dimensões continentais como o Brasil é mínimo, o que diminui a concorrência e permite a cobrança de preços abusivos. Só para termos uma noção da carga tributária mencionada acima, listo alguns exemplos. Em dez estados e no Distrito Federal, apenas o ICMS é de 25%, enquanto em outros chega a 35%, como em Rondônia. A maioria dos impostos é calculada sobre a receita bruta; a conta telefônica, por exemplo, inclui todos os impostos. Para os estados com ICMS de 25%, os principais impostos e taxas (Cofins, PIS/Pasep, ICMS, Fust e Funtel) equivalem a 30% do valor da conta, mas se calculados sobre o valor líquido chegam a 43%. Nos estados com ICMS mais alto, a carga tributária total é mais elevada, chegando a 49% em Rondônia.

É a lei da oferta e procura. Se tivermos um setor com pouca competição e cuja regulação seja ineficiente, isso tornará o consumidor refém dos preços cobrados, o que prejudica e bloqueia o desenvolvimento do país.

Em maio de 2010, foi lançado pelo Ministério das Comunicações um Plano Nacional de Banda Larga (PNBL), por meio do Decreto nº 7.175, porém, seus resultados ainda são incipientes. O objetivo do PNBL é acelerar o acesso da população à sociedade da informação, e um dos principais instrumentos para sua execução é a Telebras, a companhia federal de telecomunicações inativa desde a privatização das telefônicas estaduais em 1998 e que, sob a supervisão do Ministério das Telecomunicações, foi ressuscitada com esse propósito. Outro problema de fácil identificação é que a Lei Geral das Telecomunicações mantém o anacronismo de priorizar a telefonia fixa¹¹. Um dos problemas que o Brasil encontra na ineficiência da banda larga é a questão da qualidade. Como sucessivos governos passam a ideia de que universalização do acesso é mais importante do que qualidade, o plano mencionado acima exigia que as operadoras oferecessem seus serviços com preços baixos, porém sem considerar a qualidade como um fator primordial. Em 2013, o governo anunciou que investiria pesadamente em infraestrutura, levando fibra óptica para as 5.570 cidades do Brasil – atualmente, em torno de 3.643 cidades são conectadas por essa tecnologia, ainda que a qualidade deixe a desejar, e as redes são administradas pelas quatro maiores companhias do setor (Vivo, Claro, TIM e Oi)¹¹.

Em 2012, as vendas do setor de tecnologia da informação corresponderam a 5,2% do PIB brasileiro. Nas nações ricas, esse percentual fica entre 7% e 8%. Valores esses que, temos de considerar, sofrem aumentos ano após ano. De acordo com o 15º Relatório Global de Tecnologia da Informação,

divulgado pelo Fórum Econômico Mundial⁹, o Brasil está em 84º lugar no *ranking* de competitividade no setor de Tecnologia da Informação (TI), que avalia a influência e impactos da Tecnologia da Informação e Comunicação (TIC) para o desenvolvimento de 144 países⁹. Uma queda de 15 posições desde o ano passado e de 19 posições desde 2012. O país ficou atrás até de populações economicamente menos desenvolvidas como El Salvador ou Ruanda⁹.

A edição de 2015 do Relatório Global de Tecnologia de Informação apontou para o crescente abismo digital existente entre países, sendo que apenas uma menor parte da população do mundo é beneficiada economicamente e socialmente pelo uso das tecnologias. O estudo indicou como as economias emergentes não exploram o potencial das tecnologias de informação e comunicações para conduzir a transformação social e econômica necessária para que possam atingir o nível das economias mais avançadas.

De acordo com o estudo, apenas 39% da população mundial tem acesso à internet, apesar de mais de metade possuir um telefone celular⁹. Como era de se esperar, a edição 2015 do Relatório indicou que as economias de alta renda ocupam os 30 primeiros lugares. Singapura é o país que melhor aproveita as TICs para o impacto social e econômico, seguido da Finlândia e da Suécia. São 7 países europeus, 2 asiáticos e apenas um americano entre os 10 melhores colocados.

Com base em dados de 2012, ele sugere que o país trabalhe com a meta de quase dobrar o mercado local de TI até 2022, saindo do faturamento atual, que equivale a 123 bilhões de dólares, e chegando a 230 bilhões de dólares¹². Entretanto, nos anos de 2012-2016 o Brasil desabou em investimentos.

O desempenho do Brasil é particularmente sombrio no ambiente político e regulatório e nos pilares dos ambientes de negócios de inovação, onde ocupa a 95ª e 121ª posições, respectivamente (embora tenha melhorado com 14 lugares na última categoria). O nível de tributação do país (137ª posição), e a medida do seu tapete vermelho – o Brasil classifica-se notadamente em 137ª posição para o tempo necessário para se iniciar um negócio – e atrasos de seu sistema judiciário estão entre as muitas fraquezas institucionais que explicam esta situação. A falta de preparação da população (108ª), medida pelo nível geral de educação, atua como outro empecilho para a capacidade do país em aproveitar as Tecnologias de Informação e Comunicação (TIC) mais plenamente. Vai ver que é por isso que o tempo do brasileiro em uso da internet é desperdiçado em redes sociais, ao invés de se enriquecer em conhecimentos. A utilização das TIC entre a população tem vindo a melhorar, mas não tão rapidamente como em outros países, fazendo com que o Brasil

escorregue para baixo do ranking para 62^a nesta dimensão. Além disso, o governo não conseguiu fazer a TIC um controlador central de sua estratégia de desenvolvimento (106^a), previsto em 2012, sugerindo que não cumpre com o que se planeja, ou não tem competência para tal. Por conseguinte, os benefícios econômicos e sociais da TIC permanecem muito limitados (76^a e 73^a posições, respectivamente)⁹.

Um dos requisitos básicos para qualquer nação que queira crescer e que possa fornecer melhor qualidade de vida para sua população, à semelhança de qualquer pessoa que queira crescer em uma empresa e, assim, oferecer maior conforto para sua família, é tornar-se competitivo internacionalmente, por isso, o estudo da McKinsey & Company apresenta a relevância de se aumentar as exportações de 2% das receitas do setor de tecnologia da informação para 8%. Atingindo esses objetivos, 1,5 milhão de empregos diretos poderão ser criados, além de se disseminar o uso da TI e da internet rápida entre hospitais, escolas, órgãos públicos e pequenas e médias empresas de todo o país.

Para se alcançar esses objetivos, um obstáculo precisa ser superado: exatamente o da melhora na qualidade da rede de banda larga do país, finaliza o estudo da McKinsey¹². Notadamente, são ações sugeridas em 2012, porém até então as medidas para estas ações não foram efetivadas imediatamente – algo que os coreanos já fazem desde os anos 90.

27.4 INOVAÇÃO E EMPREENDEDORISMO

Problema apresentado pelo Brasil

O país ocupava o 64º lugar no índice global de inovação, em uma lista com 142 países, segundo estudo da Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI) com a Universidade de Cornell (EUA) e a escola de administração francesa Insead, de 2013. Em 2015, passou a ocupar o 70^a lugar ⁹.

Exemplo a ser seguido

Israel.

Solução para o desenvolvimento do Brasil

Segundo relatório produzido pela Thomson Reuters, o Brasil ocupa o 14º lugar como produtor mundial de pesquisas – um salto de três posições desde 2001 –, mas a burocracia e a falta de investimento ainda emperram o processo de desenvolvimento do setor. Sem inovação, não conseguiremos ter produtos atrativos que gerem interesse no mercado internacional, e nesse quesito o Brasil também não tem sido eficiente. Em 2013, o país ocupava o 64º lugar no índice global de inovação, numa lista com 142 países, segundo estudo da Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI) com a Universidade de Cornell (EUA) e a escola de administração francesa Insead, seis posições a menos que em 2012! Em 2015, o país caiu para 70ª posição⁹.

Israel foi fundado em 1948, com uma geografia que consiste em um deserto ao sul (o deserto de Negev, que corresponde a 16 mil Km² dos seus 27 mil Km² de território) e montanhas cobertas por neve ao norte. Um território com bens naturais muito escassos, bem ao contrário do Brasil, cujo território de 8.515.767 Km² inclui 8.460.415 Km² de terra e 55.352 Km² de água. A nação israelense – já que seu povo, apesar de distribuído em diferentes continentes, levanta-se para apoiar esse ínfimo pedaço de terra –, passou as últimas décadas investindo em tecnologia para compensar seus escassos recursos naturais. Hoje, Israel é um dos cinco maiores produtores de patentes por habitante do mundo, ficando atrás somente de Estados Unidos, Japão, Suíça e Finlândia.

Em 2012, obtive o registro de quase 2,5 mil patentes nos Estados Unidos, enquanto o Brasil não chegou a 270. Israel também apresenta a maior densidade de empresas de tecnologia do mundo. São 4,8 mil em uma população de 8 milhões. No Brasil, temos cerca de 10 mil empresas de tecnologia para uma população de pouco mais de 200 milhões de habitantes. E ainda é preciso considerar que muitas dessas empresas existem somente no papel e não desenvolvem e nem produzem nada de novo. Aliás, quando se diz que há uma inovação, são produtos cujas partes são importadas e montadas para revenda. Obviamente existem exceções, mas são a minoria, como será discutido adiante.

Considerando os países membros do BRICS e a Coreia do Sul, para efeito de comparação, o Brasil encontra-se somente na faixa da África do Sul em relação ao número de pedidos e concessões de patentes de invenção nos Estados Unidos, o maior mercado consumidor e produtor (Figura 27.1).

Israel também ocupa o primeiro lugar no *ranking* que mede o percentual de investimento do PIB em pesquisa em desenvolvimento: 4,5%. O Brasil

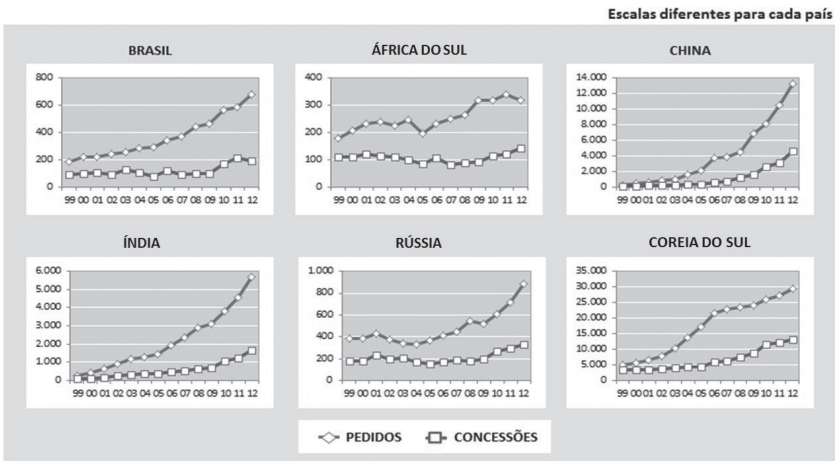


Figura 27.1 Pedidos e concessões de patentes de invenção junto ao Escritório Americano de Marcas e Patentes (USPTO, na sigla em inglês) de países selecionados, 1999-2014. Países BRICS* e Coreia do Sul.

Fonte(s): Escritório Americano de Marcas e Patentes (USPTO, na sigla em inglês), 2015¹³.

investe 1% (Figuras 27.2 a 27.4 e Tabela 27.4). Como um país do tamanho de Sergipe conseguiu tudo isso?

Tabela 27.4 Brasil: Comparação dos dispêndios em pesquisa e desenvolvimento (P&D) com o produto interno bruto (PIB) (2000-2013, em milhões de R\$ e valores de 2013)¹

| | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012(2) | 2013(2) |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| TOTAL | | | | | | | | | | | | | | |
| Dispêndios em P&D | 34.655,4 | 35.664,4 | 34.909,8 | 34.990,1 | 35.666,8 | 38.278,9 | 39.253,5 | 45.584,9 | 49.977,6 | 49.438,1 | 55.048,2 | 56.239,3 | 57.786,6 | 63.748,6 |
| Índice (2000=100) | 100,0 | 102,9 | 100,7 | 101,0 | 102,9 | 110,5 | 113,3 | 131,5 | 144,2 | 142,7 | 158,8 | 162,3 | 166,7 | 184,0 |
| % em relação ao PIB | 1,04 | 1,06 | 1,01 | 1,00 | 0,96 | 1,00 | 0,99 | 1,08 | 1,13 | 1,12 | 1,16 | 1,14 | 1,15 | 1,24 |

* Em economia, **BRICS** é um acrônimo que se refere aos países membros fundadores (o grupo BRIC: Brasil, Rússia, Índia e China) e à África do Sul, que juntos formam um grupo político de cooperação. Em 14 de abril de 2011, o “S” foi oficialmente adicionado à sigla BRIC para formar o BRICS, após a admissão da África do Sul (em inglês, South Africa) ao grupo. Os membros fundadores e a África do Sul estão todos em um estágio similar de mercado emergente, devido ao seu desenvolvimento econômico. É geralmente traduzido como “os BRICS” ou “países BRICS” ou, alternativamente, como os “Cinco Grandes”.

| | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012(2) | 2013(2) |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| DISPÊNDIOS PÚBLICOS | | | | | | | | | | | | | | |
| Dispêndios em P&D | 17.916,8 | 19.009,6 | 18.023,7 | 17.987,2 | 17.652,8 | 18.245,0 | 19.639,3 | 23.531,1 | 25.167,2 | 25.853,4 | 28.138,2 | 29.748,7 | 31.743,0 | 36.783,7 |
| Índice (2000=100) | 100,0 | 106,1 | 100,6 | 100,4 | 98,5 | 101,8 | 109,6 | 131,3 | 140,5 | 144,3 | 157,0 | 166,0 | 177,2 | 205,3 |
| % em relação ao PIB | 0,54 | 0,57 | 0,52 | 0,51 | 0,48 | 0,48 | 0,49 | 0,56 | 0,57 | 0,59 | 0,59 | 0,60 | 0,63 | 0,71 |
| GOVERNO FEDERAL | | | | | | | | | | | | | | |
| Dispêndios em P&D | 11.057,4 | 11.647,6 | 11.213,1 | 11.825,2 | 12.136,9 | 12.464,2 | 13.987,8 | 16.185,6 | 17.179,4 | 17.849,8 | 19.589,4 | 20.053,2 | 21.324,0 | 25.802,5 |
| Índice (2000=100) | 100,0 | 105,3 | 101,4 | 106,9 | 109,8 | 112,7 | 126,5 | 146,4 | 155,4 | 161,4 | 177,2 | 181,4 | 192,8 | 233,4 |
| % em relação ao PIB | 0,33 | 0,35 | 0,32 | 0,34 | 0,33 | 0,33 | 0,35 | 0,38 | 0,39 | 0,40 | 0,41 | 0,41 | 0,42 | 0,50 |
| GOVERNO ESTADUAL | | | | | | | | | | | | | | |
| Dispêndios em P&D | 6.859,4 | 7.362,0 | 6.810,7 | 6.161,9 | 5.515,9 | 5.780,8 | 5.651,6 | 7.345,4 | 7.987,8 | 8.003,6 | 8.548,8 | 9.695,5 | 10.419,0 | 10.981,3 |
| Índice (2000=100) | 100,0 | 107,3 | 99,3 | 89,8 | 80,4 | 84,3 | 82,4 | 107,1 | 116,4 | 116,7 | 124,6 | 141,3 | 151,9 | 160,1 |
| % em relação ao PIB | 0,21 | 0,22 | 0,20 | 0,18 | 0,15 | 0,15 | 0,14 | 0,17 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,20 | 0,21 | 0,21 |
| SETOR EMPRESARIAL | | | | | | | | | | | | | | |
| Dispêndios em P&D | 16.738,6 | 16.654,8 | 16.886,1 | 17.002,9 | 18.014,0 | 20.033,9 | 19.614,2 | 22.053,8 | 24.810,4 | 23.584,7 | 26.910,0 | 26.490,6 | 26.043,5 | 26.964,9 |
| Índice (2000=100) | 100,0 | 99,5 | 100,9 | 101,6 | 107,6 | 119,7 | 117,2 | 131,8 | 148,2 | 140,9 | 160,8 | 158,3 | 155,6 | 161,1 |
| % em relação ao PIB | 0,50 | 0,50 | 0,49 | 0,49 | 0,49 | 0,52 | 0,49 | 0,52 | 0,56 | 0,53 | 0,57 | 0,54 | 0,52 | 0,52 |

Fonte(s): Coordenação-Geral de Indicadores (CGIN) – ASCAV/SEXEC – Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI)¹⁴.

Nota(s): 1) Valores obtidos através dos multiplicadores utilizados pelo Banco Central para deflacionar o PIB, publicados na tabela “Produto Interno Bruto e taxas médias de crescimento” em <http://www.bcb.gov.br/?INDECO>. 2) Dados preliminares.

A Tabela 27.4 pode ser melhor visualizada por meio gráficos das Figuras 27.3 e 27.4, que deixam claro que os investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) dos governos federal e estadual não crescem anualmente, mas sim, em alguns anos, decrescem. Talvez isso ocorra porque o setor público não consegue perceber tais gastos como investimento, e sim como

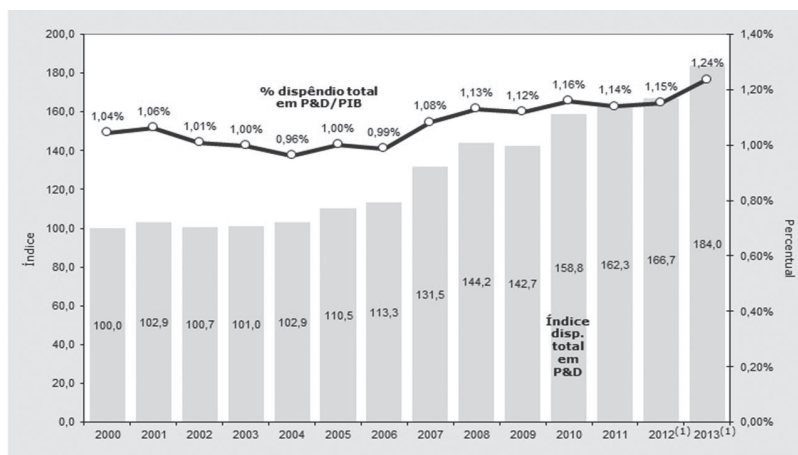


Figura 27.2 Relação de investimento em pesquisa e desenvolvimento pelo Estado e pela iniciativa privada no mundo. A grande diferença entre o Brasil e os outros países desses grupos é o volume de investimento em pesquisa e desenvolvimento feito pela iniciativa privada. O 0,55% do PIB aplicado pelas empresas brasileiras está longe dos 2,68% investidos pelo setor privado da Coreia do Sul ou dos 1,22% da China, por exemplo. Quando se comparam os investimentos públicos, no entanto, os gastos do Brasil estão na média das nações mais desenvolvidas: o 0,61% do PIB brasileiro está próximo do percentual investido pelo conjunto dos países da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE)* (0,69%).

despesas, tal qual ocorre com a educação no país. Além do mais, o governo não atualizou os números correspondentes aos anos em que houve a pior crise desde o início da década de 1990.

Um dos gargalos é a promoção da inovação nas empresas. A promoção da inovação no setor produtivo é um dos pilares da Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação (ENCTI). No Brasil, em 2013, 40,3%, do gasto em P&D é feito pelas empresas, enquanto em vários dos países mais dinâmicos tecnologicamente (Estados Unidos, Alemanha, China, Coreia do Sul e Japão) essa proporção está perto de 75%, e o montante investido é sempre quase o triplo ou o quádruplo do brasileiro (Figura 27.5), o que demonstra que a participação do setor empresarial nos esforços tecnológicos brasileiros ainda está aquém dos níveis observados internacionalmente. Em 2011, a participação de empresas correspondia a 45,7%.

* Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE): organização internacional com 34 países que aceitam os princípios da democracia representativa e da economia de livre mercado. Os membros têm economias de alta renda e alto IDH e são considerados países desenvolvidos, exceto México, Chile e Turquia. Teve origem em 1948 para ajudar a administrar o Plano Marshall para a reconstrução da Europa após a Segunda Guerra Mundial.

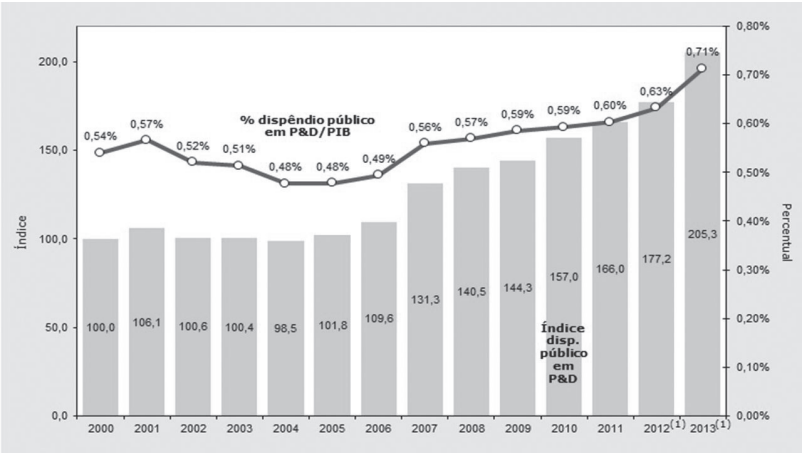


Figura 27.3 Brasil: Comparação entre o índice real de crescimento do dispêndio total em pesquisa e desenvolvimento (P&D) e o percentual do dispêndio total em relação ao PIB, 2000-2013.

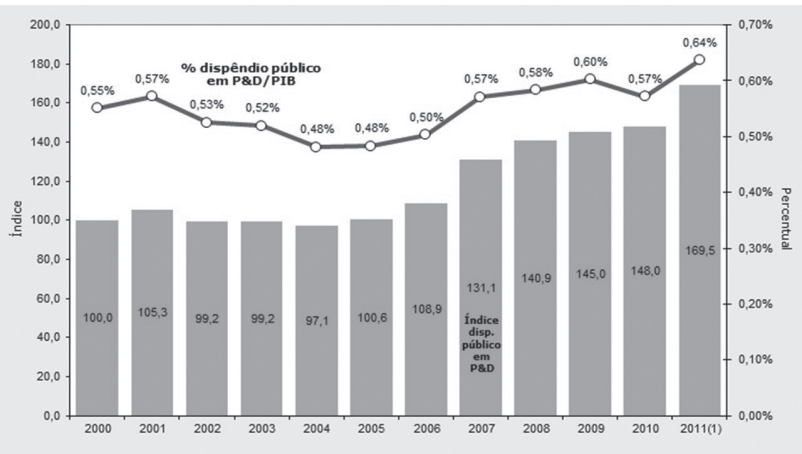


Figura 27.4 Brasil: Comparação entre o índice real de crescimento do dispêndio público em pesquisa e desenvolvimento (P&D) e o percentual do dispêndio público em relação ao PIB, 2000-2011.

Agrava-se a situação porque, historicamente, boa parte das inovações realizadas pelo setor produtivo brasileiro está relacionada a inovações de processo – majoritariamente baseadas na aquisição de tecnologias incorporadas em máquinas e equipamentos – ou a inovações adaptativas. Embora a taxa

de inovação na indústria (número de empresas inovadoras em relação ao total) tenha crescido de 33,4%, para 38,1% entre 2005 e 2008, apenas 4,1% das empresas industriais criaram um produto efetivamente novo, ou substancialmente aperfeiçoado, para o mercado nacional. Esse comportamento adaptativo está associado ao baixo investimento em P&D do setor empresarial brasileiro, uma vez que esse tipo de inovação requer menores esforços tecnológicos e implica em número extremamente baixo de pesquisadores que exercem atividades no âmbito das empresas, quando comparado com outros países. No Brasil, a maior parte dos pesquisadores está nas instituições de ensino superior – 67,5% do total em 2010 –, enquanto nas empresas essa proporção é de apenas 26,2%, bastante abaixo dos índices de países como Estados Unidos, Coreia do Sul, Japão, China, Alemanha, França e Rússia¹⁵.

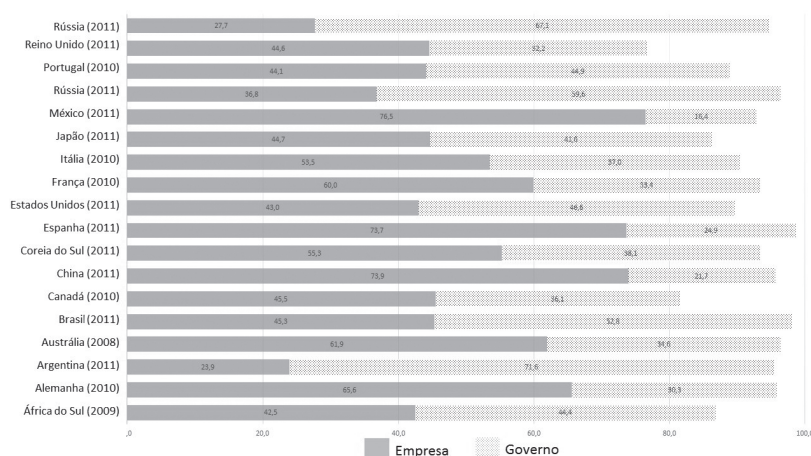


Figura 27.5 Distribuição percentual dos dispêndios nacionais em pesquisa e desenvolvimento (P&D), segundo setor de financiamento, países selecionados, 2012-2013¹⁵. Notas: 1) Os percentuais não somam 100% porque foram considerados apenas os setores de maior relevância, governo e empresas. Não foram considerados os demais setores: ensino superior, instituições privadas sem fins de lucro e estrangeiro. 2) não foi considerada a pós-graduação do setor empresas. 3) no setor Governo inclui empresas estatais.

O que faz uma nação tão pequena em território geográfico ser assim exponencial em inovação? Como nos Estados Unidos, Israel faz das universidades muito mais que instituições empreendedoras: tem em seus funcionários e alunos uma cultura empreendedora. Os professores comandam laboratórios como se fossem seu próprio negócio, e os alunos são incentivados a criar suas *start-ups*. No entanto, no Brasil, ainda não há muito incentivo

para essas questões nas universidades. Primeiro, não há divisão entre professores de ensino e professores cientistas, ou seja, um mesmo professor precisa exercer ambas as funções. Em segundo, não há meritocracia na progressão, que depende fundamentalmente do tempo de trabalho. E em terceiro, criando-se um produto inovador, é preciso solicitar que a universidade faça o pedido de depósito da patente, o que leva meses. Se o professor arriscar-se a fazer o depósito por si mesmo, pode ser processado por roubo de propriedade privada do governo, mesmo tendo sido o inventor. Um professor em regime de dedicação exclusiva em uma universidade pública não pode, por contrato, abrir uma empresa. Já em Israel e nos Estados Unidos, ocorre o contrário: o professor é até incentivado.

A Tabela 27.5 apresenta ainda a proporção da população envolvida em pesquisa no Brasil. Para efeito de comparação, apresenta-se também o número de pessoas ocupadas em cada país.

Tabela 27.5 Pesquisadores em pesquisa e desenvolvimento (P&D), em equivalência de tempo integral, de países selecionados (2000-2013, em pesquisadores por mil pessoas ocupadas)

| PAÍS | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 |
|----------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|----------|----------|----------|
| África do Sul | — | 1,2 | — | 1,2 | 1,5 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | — |
| Alemanha | 6,5 | 6,6 | 6,7 | 6,9 | 6,9 | 6,9 | 7,1 | 7,2 | 7,4 | 7,8 | 8,0 | 8,1 | 8,4 | 8,5 |
| Argentina | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 1,9 | 2,0 | 2,2 | 2,3 | 2,5 | 2,6 | 2,8 | 2,9 | 2,9 | 2,9 |
| Austrália | 7,3 | — | 7,8 | — | 8,3 | — | 8,5 | — | 8,6 | — | — | — | — | — |
| BRASIL | — | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | — | — | — | — |
| Canadá | 7,1 | 7,5 | 7,4 | 7,7 | 8,0 | 8,3 | 8,4 | 8,9 | 9,0 | 8,8 | 9,1 | 9,2 | 8,8 | — |
| China | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,5 | 1,6 | 1,9 | 2,1 | 1,5 | 1,6 | 1,7 | 1,8 | 1,9 |
| Cingapura | 7,7 | 7,7 | 8,4 | 9,4 | 9,7 | 10,3 | 10,0 | 10,0 | 9,4 | 10,2 | 10,3 | 10,4 | 10,2 | — |
| Coreia do Sul | 5,1 | 6,3 | 6,4 | 6,8 | 6,9 | 7,9 | 8,6 | 9,5 | 10,0 | 10,4 | 11,1 | 11,9 | 12,8 | 12,8 |
| Espanha | 4,6 | 4,6 | 4,7 | 5,1 | 5,3 | 5,5 | 5,6 | 5,8 | 6,1 | 6,7 | 6,9 | 6,8 | 6,9 | 6,9 |
| Estados Unidos | 7,1 | 7,3 | 7,5 | 8,0 | 7,8 | 7,6 | 7,7 | 7,6 | 8,1 | 8,8 | 8,5 | 8,8 | 8,7 | — |
| França | 6,7 | 6,8 | 7,1 | 7,4 | 7,7 | 7,7 | 7,9 | 8,2 | 8,4 | 8,7 | 9,1 | 9,2 | 9,6 | 9,8 |
| Itália | 2,9 | 2,8 | 3,0 | 2,9 | 3,0 | 3,4 | 3,5 | 3,7 | 3,8 | 4,1 | 4,2 | 4,3 | 4,5 | 4,9 |
| Japão | 9,9 | 10,0 | 9,7 | 10,1 | 10,0 | 10,4 | 10,4 | 10,4 | 10,0 | 10,1 | 10,2 | 10,2 | 10,0 | 10,2 |
| México | — | 0,6 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 1,0 | 0,8 | 0,8 | — | — |
| Portugal | 3,3 | 3,5 | 3,7 | 4,0 | 4,1 | 4,2 | 4,9 | 5,6 | 8,0 | 8,1 | 8,5 | 9,2 | 9,3 | 9,7 |
| Reino Unido | 6,2 | 6,5 | 7,1 | 7,7 | 8,0 | 8,6 | 8,7 | 8,6 | 8,5 | 8,8 | 8,8 | 8,6 | 8,7 | 8,7 |
| Rússia | 7,8 | 7,8 | 7,4 | 7,3 | 7,1 | 6,8 | 6,7 | 6,6 | 6,4 | 6,4 | 6,3 | 6,3 | 6,2 | 6,2 |

Fonte: Organisation for Economic Co-operation and Development, Main Science and Technology Indicators, 2015/1 e Brasil: Coordenação-Geral de Indicadores (CGIN) – ASCAV/SEXEC – Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI)¹⁶.

A economia do Vale do Silício, onde estão as grandes empresas americanas de internet e a Universidade Stanford, tem sido um dos principais motores da recuperação americana: tem crescido o dobro da média nacional. Apesar de existirem no Brasil algumas poucas iniciativas entre o setor privado e as instituições de ensino, ainda há muita resistência a esse tipo de cooperação.

Existe no Brasil um misto de ausência de conhecimento sobre o setor privado com preconceito contra o capitalismo. Atualmente, a maioria dos professores que ocupam posição de chefia ainda remoem os anos da ditadura com uma dose de comunismo para todos, exceto para quem está no comando.

A inovação que é desenvolvida em Israel é classificada como sendo uma inovação disruptiva, ou radical, do tipo que cria novos nichos de mercados – ao contrário da inovação incremental, que melhora tecnologias previamente existentes.

As inovações disruptivas são as responsáveis pelo crescimento alavancado de nações com rendas acima da média ou alta renda, já que criam novos mercados, possibilitando que outros países pobres comprem suas novidades. Como mostra o exemplo israelense, o caminho da inovação é longo, mas costuma ser recompensador.

27.5 ENSINO SUPERIOR

Problema apresentado pelo Brasil

O Brasil forma profissionais de áreas ligadas à infraestrutura, como engenheiros; profissionais das áreas humanas, como administradores e economistas; e profissionais da área de saúde com muita pouca qualidade, tanto para sustentar o avanço da economia quanto para promover o bem necessário à população.

Exemplo a ser seguido

Japão.

Solução para o desenvolvimento do Brasil

Como ensina a história das nações que se tornaram ricas nas últimas décadas, uma condição fundamental para o aumento do nível de renda da população acima de um patamar médio é a necessidade de se ter mão de obra qualificada, com formação sólida em universidades de qualidade, que não se resuma ao número de graduados e de fato possua conhecimento para aplicação prática. Um exemplo clássico é o Japão.

Essa nação saiu da Segunda Guerra Mundial empobrecida, quebrada e destruída, tanto em infraestrutura (lembremos das duas bombas atômicas lançadas sobre importantes centros comerciais) quanto em termos populacionais. Seu PIB por habitante não passava de 3 mil dólares, valores atualizados. Contudo, o sentimento de nação de seu povo ultrapassava o âmbito político: a própria sociedade, construída com base em uma cultura de respeito, disciplina e meritocracia, soube aplicar os investimentos estrangeiros para ajudar na sua reconstrução do país.

Divisão de trabalho e foco em duas metas essenciais para a reconstrução da nação foram seguidas: inovação industrial e formação de engenheiros – sendo que a primeira dependeria do sucesso da segunda. O resultado foi a posição de vanguarda tecnológica do Japão em pouco mais de uma década.

Reflexos dessa política persistem até hoje: quase 20% dos jovens japoneses que se formam nas universidades escolheram a engenharia como carreira. Já no Brasil, essa participação é de 11,4%.

Os programas REUNI e PROUNI vieram com o objetivo de reduzir a demanda represada no Ensino Médio, e a intenção era aumentar o número de graduados no Brasil. Embora tenha havido um acréscimo impressionante no número de graduandos no país (ver discussão adiante), a qualidade foi deixada de lado. Os alunos que concluem o Ensino Médio não podem ser reprovados; consequentemente, são aprovados sem ter o mínimo conhecimento necessário para prosseguir seus estudos no Ensino Superior. A implementação do ENEM praticamente obrigou as universidades públicas federais a aceitarem seu modo de funcionamento e realização, caso contrário a verba destinada à instituição para ampliação e melhoria de suas instalações seria retida pelo governo federal.

O Brasil está entre os países que mais reduziram o número de estudantes na faixa de 15 anos com baixo rendimento em matemática no período de 2003 a 2012¹⁷. Conforme dados divulgados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), a Alemanha, a Itália, o México e Portugal também estão nesta lista.

Um relatório publicado pela OCDE recomenda que, para ampliar os ganhos de rendimento dos estudantes, os países aumentem o acesso à educação na infância, a oferta de atividades diferenciadas para alunos com dificuldades e o incentivo à participação dos pais e da comunidade na vida escolar¹⁷.

O relatório traz uma nova análise do Programa Internacional de Avaliação de Alunos (Pisa), divulgado em 2013, mas com dados referentes a 2012. O estudo “Alunos de baixo desempenho: por que ficam para trás e como ajudá-los?” examina o baixo desempenho na escola olhando para a família, práticas escolares, políticas educacionais entre outros fatores¹⁷.

Apesar da melhora em relação aos conhecimentos básicos, os alunos brasileiros ficaram apenas no 58º lugar em matemática entre os 65 países e territórios analisados no último estudo do Pisa. Com essa classificação, o Brasil se situa abaixo da Albânia e da Costa Rica.

A organização considera que os alunos que ficam abaixo do nível 2 (entre os seis existentes, que evoluem de acordo com o grau de dificuldade das perguntas) nas disciplinas analisadas (matemática, leitura e ciências) terão dificuldades na escola e, mais tarde, no mercado de trabalho, e poderão não ascender socialmente.

Segundo o Pisa, 67,1% dos alunos brasileiros com 15 e 16 anos (faixa etária analisada no estudo) estão abaixo do nível 2 em matemática, com baixa performance na disciplina. Apenas 0,8% dos alunos brasileiros atingiram os níveis 5 e 6 na disciplina, que exigem análises complexas. Em Xangai, na China, primeiro do ranking em matemática, mais da metade dos estudantes (55,4%) integram os níveis 5 e 6, de alta performance.

Em matemática, a média dos países da OCDE é de 494 pontos. Essa mesma instituição destaca que o Brasil registrou uma das maiores taxas de crescimento no total de pontos em matemática entre 2003 a 2012, passando de 356 a 391 pontos no período.

27.5.1 Matrículas na educação

De acordo com dados do último censo da Educação Básica do Inep/MEC de 2012, existem no Brasil 8.376.852 alunos matriculados no Ensino Médio. Já o Ensino Médio técnico conta com pouco mais de 1,3 milhão de alunos em todo o país.

No Ensino Superior, segundo o mesmo censo, temos 7.037.688 alunos. Destes, 5.923.838 são alunos de cursos presenciais (um crescimento de 3,1%

em relação ao ano de 2011) e 1.113.850 de educação a distância (aumento de 12,2% no mesmo período).

Em 2012, 11.957.756 candidatos inscreveram-se para vestibulares, mas apenas 4.653.756 vagas foram oferecidas. Desses quase 12 milhões de pessoas, 6.738.819 candidataram-se para universidades públicas, enquanto 5.218.937 escolheram as particulares. Infelizmente, somente 23% desses quase 12 milhões (2.747.089) conquistaram o sonho de entrar em uma faculdade. Ou seja, 9.210.667 não tiveram acesso à educação superior naquele ano.

Dos quase 7 milhões em busca de uma oportunidade em escolas federais, estaduais e municipais, apenas 8% são aprovados (547.897). Nas privadas, a porcentagem sobe para 42% (2.199.192) dos pouco mais de 5 milhões inscritos. Do total de ingressantes, 20% (547.897) vão para uma instituição de ensino pública, enquanto 80% (2.199.192) a uma particular.

Com relação à pós-graduação, temos no Brasil 203.717 mil alunos. Ou seja, apenas 2,9% em relação ao índice de estudantes da graduação. No entanto, houve um aumento de 8,5% em relação ao último censo de 2011. Um alerta aqui deve ser dado: os únicos programas de pós-graduação com controle de números são os de mestrado e doutorado e, em 2014, os de pós-doutorados, o que significa que sobre os de especialização o Ministério da Educação não tem qualquer controle.

27.5.2 Ensino Superior

De 2002 a 2012, o número de alunos na educação superior dobrou, passando de 3,5 milhões para 7 milhões. Já o total de concluintes deu um salto de 119%, passando de 479.275 para 1.050.413. É importante ressaltar o número de licenciados com o diploma na mão: 130.790 (12,5% do número total de formados), podendo exercer o cargo de professor no Ensino Médio.

Os ingressantes também evoluíram 87,4% em 2012: atualmente, 2.747.089 entram no Ensino Superior, contra 1.465.605, há dez anos. São 31.866 cursos de graduação, distribuídos em 2.416 instituições (304 públicas e 2.112 particulares).

Apesar do avanço no número de formandos, apenas 38% dos calouros concluem o curso superior, sendo 237.546 no setor público e 812.867 no privado. Grande parte desses estudantes não conclui ou abandona o curso, provavelmente por falta de condições financeiras. Esses números provam a importância do estágio, pois ele ajuda o futuro profissional a custear seu

curso. Afinal, para estagiar, o jovem obrigatoriamente precisa estar regularmente matriculado.

Dos mais de 7 milhões de jovens universitários, 67,1% optaram pelo bacharelado, enquanto 19,5% fazem licenciatura e 13,5% são tecnólogos. Cerca de 5.140.312 (73%) estão na universidade particular e 1.897.413 (27%) na pública. No total, 31.866 cursos diferentes são oferecidos no Brasil.

27.5.3 Qualidade

A questão da falta de qualidade é demonstrada pelo fato de que na lista das 200 melhores universidades do mundo não há nenhuma brasileira. A deficiência se reflete no desempenho dos formados no país.

Uma pesquisa recente da consultoria McKinsey & Company avaliou o desempenho dos engenheiros em 83 multinacionais que atuam em países emergentes, e mostra que apenas 13 em cada 100 engenheiros brasileiros têm formação considerada adequada para a área em que atuam¹². Na Hungria, o melhor entre os emergentes, esse número é de 50%. A defasagem não se limita à engenharia. O mesmo se dá, na mesma proporção, com profissionais de finanças e contabilidade.

Para os economistas, a situação do Brasil em relação à formação de engenheiros – elemento básico no motor de desenvolvimento de um país – tem um impacto considerável na produtividade média do trabalhador brasileiro. A produtividade no Brasil está estagnada há três décadas: nosso produto *per capita* de 20 mil dólares por ano é um quarto do produto *per capita* japonês.

Nos últimos anos, o Brasil evoluiu consideravelmente na oferta de cursos de ensino superior – em 2013, cerca de 20% dos brasileiros entre 18 e 24 anos de idade tinham acesso à universidade, 120% mais do que em 2000. Os números mostram que o avanço da qualidade desses cursos, no entanto, não ocorreu na mesma velocidade. Eis o desafio do Brasil para os próximos anos – e décadas.

Um relatório produzido pela empresa de sistemas de aprendizado Pearson (ligada ao jornal britânico *Financial Times*) e pela consultoria britânica *Economist Intelligence Unit* (EIU) exibe um *ranking* que compara resultados de provas de matemática, ciência e leitura e índices como taxa de alfabetização e aprovação escolar, no qual, em 2012, o Brasil ficou em penúltimo lugar. Em 2014, o Brasil distanciou-se ainda mais das médias dos 40 países estudados, mas, apesar de seu índice ter piorado, subiu uma posição

no *ranking* – de penúltimo para antepenúltimo –, mas isso se deveu a uma queda acentuada do México, e não a uma melhora na situação do Brasil. Assim, em 2014, o Brasil aparece na 38ª posição do *ranking*, apenas à frente de México e Indonésia.

O indicador do *ranking* é composto a partir de duas variáveis: capacidade cognitiva (medida por resultados de alunos nos testes internacionais PISA, TIMSS e PIRLS) e sucesso escolar (índices de alfabetização e aprovação escolar). Note-se aqui que nem mesmo a aprovação escolar obrigatória (já que atualmente no Brasil não há reprovação, por vários motivos que não abordaremos) resolve o problema de posicionamento no *ranking*. Embora eficiente para as estatísticas, a política de não reprovação leva a um péssimo rendimento e aprendizagem escolar. Está aí uma boa oportunidade para mudar o atual sistema de aprovação no ensino!

O número usado para comparar os países (“*score z*”) indica quão longe cada nação está da média dos 40 países (que é zero, nessa escala). Foram analisadas nações da Ásia, da Europa e das Américas – nenhum país africano participa do *ranking*.

No estudo de 2012, o *score* obtido pelo Brasil foi de $-1,65$; em 2014, o indicador piorou para $-1,73$, sendo que o sinal negativo indica que ambos os países estão abaixo da média dos 40 países. Isso demonstra que a atual política do “aprovar sem saber” distancia ainda mais o Brasil das nações desenvolvidas, fazendo com que o povo brasileiro se torne alienado e sem conhecimento e transformando o futuro do país num caos. Fato é que o país está mais distante da média dos 40 países. Já o México viu seu *score* cair de $-1,6$ para $-1,76$.

O Brasil piorou nas duas variáveis, tanto na capacidade cognitiva, leia-se de raciocínio (de $-2,01$ para $-2,06$), quanto no sucesso escolar (de $-0,94$ para $-1,08$).

É preciso fazer uma observação: como já dito, os valores dos *scores* apresentados são sempre comparados com a média das 40 nações. Sendo assim, não é possível determinar ao certo se a piora do indicador do Brasil se deve a uma queda no desempenho dos alunos brasileiros ou se houve uma melhora na média mundial. Independentemente disso, fato é que o país está entre os últimos colocados no quesito capacidade de raciocínio e entendimento. Uma questão séria, já que se a população lê um texto mas não o compreende, então ela pode ser considerada analfabeta funcional.

27.5.4 Mais professores de ciências e matemática

Outra informação que se pode retirar do estudo é que os países em desenvolvimento estão posicionados na metade inferior do *ranking*. Como já dissemos, em 2014 a Indonésia aparece novamente em último lugar das 40 nações analisadas, precedida por México e Brasil.

O relatório também apresenta um capítulo com os modelos a serem seguidos pelos países em desenvolvimento. Um dos pontos é que o Brasil precisa de um aumento de 30% no número de professores de ciências e matemática para aliviar as pressões sob seu contingente, que está sobrecarregado e carece de treinamento e de conhecimento.

27.5.5 Ásia em alta

Na edição de 2014, houve uma reviravolta entre os primeiros colocados. No topo do *ranking*, a novidade dessa edição é a queda dos países escandinavos e a ascensão dos asiáticos.

No relatório de 2012, a Finlândia liderava o ranking, com *score* de 1,26 (valores positivos), descendo para 0,92 no relatório de 2014 – uma queda para a quinta posição, atrás de Coreia do Sul, Japão, Cingapura e Hong Kong. O relatório afirma que países escandinavos, como Suécia e Finlândia, têm visto nos últimos anos as notas de seus alunos piorarem nos testes internacionais. No caso da Finlândia, a explicação dada pelos próprios professores do país foi em relação ao ensino de matemática que tem sido deixado de lado, justamente onde houve a maior queda no índice da Finlândia. Os países asiáticos são exemplos de que a educação deve ser vista como um investimento de longo prazo, que, se aumentados os investimentos periodicamente, é capaz de elevar países em desenvolvimento à posição de nação rica.

27.6 INSTITUIÇÕES SÓLIDAS

Problema apresentado pelo Brasil

Um problema de base que dá sustentação à economia do país está em suas instituições, que carecem de credibilidade.

Exemplo a ser seguido

Estados Unidos.

Solução para o desenvolvimento do Brasil

O exemplo escolhido é a cidade de Nogales, que é dividida por um muro separando uma cidade ao norte, localizada no estado norte-americano do Arizona, e uma ao sul, localizada no estado mexicano de Sonora. Embora a população tenha a mesma composição étnica e cultural, além das mesmas condições geoclimáticas, na cidade ao norte, nos EUA, a população tem acesso à educação, moradia e tem boa saúde, com cobertura de saneamento básico para todos os bairros. Sua renda *per capita* é de cerca de 30 mil dólares. Já na cidade ao sul, no México, a população carece de saúde, educação e saneamento básico. A população jovem em idade escolar não está matriculada em escolas, o que acarreta uma alta taxa de criminalidade. Sua renda *per capita* é um terço menor que a da cidade ao norte.

O que faz uma mesma cidade, na mesma região geográfica e com o mesmo povo apresentar diferenças sociais tão acentuadas? As diferenças entre as duas cidades são suas instituições¹⁸. Acemoglu, professor no Massachusetts Institute of Technology (MIT), e Robinson, professor da Universidade de Harvard, fazem uma demonstração cabal de que são as instituições políticas e econômicas que estão por trás do êxito econômico (ou da falta dele). Eles afirmam que os países só escapam à pobreza quando dispõem de instituições econômicas adequadas, sobretudo a propriedade privada e a concorrência. São elas que dão forma aos incentivos para as decisões de investimento – em infraestrutura, na formação da mão de obra, em máquinas e na inovação. As instituições são, em resumo, o alicerce sem o qual nenhuma estrutura crucial para o crescimento consegue ficar de pé.

Quando estudamos a história do Brasil a partir de 2010, verificamos que houve um retrocesso nessa área. O início do Plano Real, em 1994, fez com que o Banco Central se tornasse uma instituição firme, mas, desde meados de 2010, sua reputação como guardião da moeda tem caído, por exemplo, com a alta da inflação. A credibilidade do Tesouro Nacional como gerente das contas públicas foi corroída por manobras que encobrem gastos. A Petrobras, a maior empresa nacional, teve uma queda vertiginosa, perdendo mais de 400 posições¹⁹. A estatal brasileira, que é uma empresa de economia mista, sendo 49% privada e 51% pública, saiu da 12ª posição de maior

valor de mercado mundial, em 2009, para a 416^a, em 2015¹⁹. Em 2013, era a 20^a¹⁹. Um círculo vicioso e ocioso de uso da máquina pública para encobrir gastos, controlar a inflação e alocar apadrinhados políticos como gestores em setores que movimentam volumosos recursos financeiros.

O setor público consolidado – governos federal, estaduais e municipais e empresas estatais – registrou superávit primário de 91,306 bilhões de reais em 2013. O superávit primário corresponde à economia de recursos para pagar os juros da dívida pública e reduzir o endividamento do governo no médio e longo prazos. O resultado de 2013 correspondeu a 1,9% de tudo o que o país produziu, ou seja, o PIB. Trata-se do menor nível anual da série histórica do Banco Central (BC), iniciada em dezembro de 2001. Em 2012, o superávit primário ficou em 104,951 bilhões de reais, o que correspondeu a 2,39% do PIB. Em 2014, o país registrou déficit primário de 32,536 bilhões de reais, o primeiro resultado negativo desde o início da série histórica, em 2001. Com isso, o saldo primário negativo foi equivalente a 0,63% do Produto Interno Bruto (PIB), também o pior já registrado. E em 2015, o déficit primário recorde foi de R\$ 111,249 bilhões ou 1,88% do Produto Interno Bruto (PIB).

A economia brasileira encolheu 3,8% em 2015 na comparação com 2014, segundo os dados do PIB (Produto Interno Bruto) divulgados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).

Essa é a maior queda desde que a atual pesquisa do IBGE começou a ser feita, em 1996. Se forem considerados os dados anteriores do PIB, que começam em 1948, é o pior resultado em 25 anos, desde 1990 (-4,3%), quando Fernando Collor de Mello assumiu o governo e decretou o confisco da poupança.

Esta é a sétima vez que o Brasil tem PIB negativo desde 1948: 1981 (-4,3%), 1983 (-2,9%), 1988 (-0,1%), 1990 (-4,3%), 1992 (-0,5%), 2009 (-0,1%) e, agora, 2015 (-3,8%).

Em valores correntes, o PIB de 2015 ficou em 5,9 trilhões de reais. O PIB per capita ficou em 28.876 reais em 2015, com queda de 4,6% em relação ao ano anterior.

Originalmente, a Lei de Diretrizes Orçamentárias (LDO) previa meta de superávit primário de 3,1% do PIB para a União, estados e municípios em 2013. Depois, o governo lançou mão de mecanismos que permitiam o abatimento de gastos do Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) e de receitas que deixaram de entrar na conta por causa de desonerações, revisando a meta para 2,3% do PIB (110,9 bilhões de reais). E, no fim de novembro de 2013, foi aprovada emenda à LDO que desobrigava a União

de compensar o descumprimento da meta dos governos estaduais e das prefeituras. A meta somente do governo central, que correspondia a 108,09 bilhões de reais, foi reduzida para 73 bilhões de reais. Todas essas reduções são interpretadas pelo mercado como falta de compromisso e seriedade, refletindo-se diretamente na descrença do Brasil como atrativo para investidores externos. Esses dados demonstram apenas o início de uma série de ações tomadas pelo governo federal atual, culminando em interrupções dos investimentos interno e externos.

Portanto, no que diz respeito ao arcabouço institucional, perdemos parte do que havíamos conquistado em duas décadas.

Quais são os critérios usados para definir o tamanho e o destino dos empréstimos dos bancos públicos? Uma instituição que usa dinheiro público tem de prestar contas à sociedade. Em 2012, houve um incêndio em um hotel em Nogales, México, e bombeiros americanos foram chamados. No caso das instituições econômicas brasileiras, quem vai apagar o fogo?

27.7 INCENTIVO NAS UNIVERSIDADES: DAS IDEIAS AOS NEGÓCIOS

Problema apresentado pelo Brasil

As universidades brasileiras não possuem estrutura para criar *start-ups*, e as que tentam construir essa estrutura não investem nas ideias certas que gerariam negócios.

Exemplo a ser seguido

Estados Unidos.

Solução para o desenvolvimento do Brasil

Dentre as universidades americanas de destaque e que estão envolvidas no assunto inovação de longa data estão a Universidade de Stanford e o Massachusetts Institute of Technology (MIT) que, ainda nos anos 1970, criaram os primeiros escritórios de gerenciamento de patentes dentro de universidades,

responsáveis por cuidar da burocracia necessária para licenciar as tecnologias e, principalmente, levá-las ao mercado. Descobrir o próximo Google é uma boa forma de conseguir prestígio, atrair bons alunos e ganhar dinheiro.

A Universidade de Stanford, onde o buscador Google foi criado, obteve só com o licenciamento do código do *software* 337 milhões de dólares. Em 2012, somente em receitas geradas pelo licenciamento e *royalties* por patentes, as universidades americanas receberam 2,6 bilhões de dólares. Desse montante, a Universidade de Nova York (NYU) foi a que teve o maior faturamento, com 185 milhões de dólares.

A estratégia adotada pela NYU foi incluir, dentre as obrigações do escritório de patentes, o casamento entre as invenções que têm potencial para se transformar em negócios ou em tecnologias para a indústria com as empresas interessadas na sua produção e comercialização. Um papel ativo, não de mero setor burocrático à espera da efetivação de uma parceria.

Por meio de um sistema meritocrático e de recompensas, em 2013, 60% das patentes licenciadas pela NYU foram comercializadas, um dos índices mais altos dos Estados Unidos. A universidade também criou 87% mais *start-ups* por dólar investido do que a média das universidades norte-americanas.

A também norte-americana Universidade de Harvard é um exemplo de fenômeno que ocorre nos escritórios de transferência de tecnologia de universidades. Esses escritórios executam as tarefas de rotina, que consistem em identificar pesquisas com potencial de gerar dividendos para a universidade e para os pesquisadores envolvidos, redigem e fazem os pedidos de patentes para protegê-las, assim como fomentam e buscam firmar colaborações de pesquisa de longo prazo entre empresas e os laboratórios de pesquisa da universidade. Eles também auxiliam aos pesquisadores líderes de grupo e seus alunos na criação de empresas baseadas em tecnologias inovadoras, fazem a busca pelos investidores do setor privado para financiá-las, ofertam consultorias de cientistas especializados para setores industriais específicos, além de impulsionar o empreendedorismo entre os alunos de graduação e pós-graduação ligados aos laboratórios de pesquisa dos professores da universidade. Os dados mostrados pela Universidade de Harvard, dentre outras universidades norte-americanas, demonstram que é factível obter resultados positivos tanto para as empresas quanto para as universidades e seus pesquisadores, independentemente de suas questões culturais e objetivos socioeconômicos, desde que haja um compromisso com parcerias em que ambos os lados saem ganhando.

Em Harvard, um dos pontos-chave para a exequibilidade desses escritórios que fazem a ponte entre os professores e os interesses das empresas foi a criação do Fundo Acelerador de Desenvolvimento Tecnológico. Esse fundo recebe recursos de doadores privados, alguns ex-alunos de sucesso empresarial, como Mark Zuckerberg, o fundador do *Facebook* – que antes, quando aluno, não possuía recursos para financiar suas ideias –, com o intuito de impulsionar o desenvolvimento de tecnologias ainda em estágio embrionário e possibilitar que essas tecnologias possam vir a ser um produto licenciado comercializado. Esse fundo fornece os recursos para a condução de pesquisas entre a fase posterior à descoberta e anterior à comercialização, comumente chamados de experimentos para gerarem provas de conceito, que definem se a tecnologia será útil para a sociedade e se terá demanda, aumentando a possibilidade de uma empresa se interessar pela tecnologia e efetuar sua compra.

Outra universidade de sucesso na condução das ideias dos pesquisadores para as prateleiras do comércio é a Universidade da Califórnia (UC), em Berkeley. Em 1990, a UC criou seu Escritório de Licenciamento de Tecnologia, influenciada pela Lei Bayh-Dole, de 1980, que assegurou às instituições de pesquisa norte-americanas o direito de patentear descobertas feitas com investimentos federais em pesquisa e licenciá-las para empresas. Engana-se quem pensa que os recursos públicos estariam sendo usados para interesses próprios porque, além de a pesquisa gerar benefícios diretamente para a sociedade, também gera novas oportunidades de emprego, novos mercados econômicos, além de impulsionar a economia e impostos para o governo. Um dos fatos que possibilitou o sucesso de sua atuação foi a criação do Ipira, sigla para Escritório de Propriedade Intelectual e Alianças de Pesquisa com a Indústria, em 2004. Além de fornecer o espaço físico e uma infraestrutura tecnológica básica para as *start-ups* operarem – o que costuma ser o padrão das universidades –, a incubadora passou a oferecer consultoria de professores e a fazer a conexão das empresas com os investidores. O Ipira executa os caminhos necessários para a proteção da propriedade intelectual das descobertas de seus pesquisadores, realizada por pessoal especializado, e a missão de busca de parceiros privados para a pesquisa na instituição, possibilitando a formação e execução de projetos patrocinados e o licenciamento pelas próprias empresas financiadoras das tecnologias que possam vir a surgir. Sempre, porém, pensando na parceria em longo prazo.

A UC hoje tem cinco incubadoras, que custaram 600 milhões de dólares. Em 2013, a universidade lançou 55 *start-ups*, o maior número entre as instituições americanas. As incubadoras são direcionadas para o setor de

biotecnologia, no qual está presente o maior potencial de desenvolvimentos de produtos que possam vir a ser utilizados pela sociedade.

Na Inglaterra, a Universidade de Oxford é um modelo no quesito empresarial. Criou uma empresa para realizar a efetivação de parcerias entre indústrias e pesquisadores da universidade, além de oferecer sua *expertise* para outras universidades e empresas de vários países na forma de serviços e consultorias. Claro que toda empresa precisa de financiamento inicial, e a Universidade de Oxford efetuou um investimento inicial de 2,5 milhões de libras esterlinas, em 2011, numa empresa batizada de Isis Innovation. Todo bom investimento tem retorno em longo prazo (nesse caso, o longo prazo foi de apenas 3 anos); quando se alia eficiência com eficácia, o retorno chegou a 4 bilhões de libras esterlinas, na forma de *royalties* e venda de participação em empresas. A Isis Innovation, de Oxford, atua em três frentes, que faltam às incubadoras de empresas das universidades brasileiras. A primeira é o papel de proteção intelectual, realizada de maneira rápida e por profissionais qualificados, para que, em seguida seja feita a busca por indústrias interessadas no licenciamento da patente. Em média, a Isis registra uma patente por semana. No ano de 2012, a Isis gerenciava em torno de 400 patentes e um portfólio de 200 licenças de comercialização de tecnologias. A ponte entre o pesquisador e as empresas interessadas é importante e não pode deixar o primeiro de fora, já que são as suas ideias que são transformadas em produtos. Não se deve descartar os geradores do conhecimento após a venda de suas tecnologias. O papel da empresa de Oxford é auxiliar os pesquisadores na efetivação do negócio com a empresa, lembrando à universidade dos benefícios gerados à sociedade, comentados anteriormente. Outra frente abordada pela Isis é o oferecimento de consultoria de pesquisadores de Oxford a empresas e órgãos públicos. Em um primeiro momento o leitor poderia dizer que seria estranho uma instituição pública brasileira oferecer consultoria para outro órgão público, mas é preciso lembrar que os serviços prestados são referentes à instituição à qual tal pesquisador está vinculado. Por exemplo, um professor de uma universidade federal não sairá prendendo político por desvio de verba pública, que é papel da polícia federal. A terceira frente está focada em auxiliar, por meio de consultorias, instituições de diversos países (dados de 2012 contavam com 30 países diferentes) a comercializarem suas invenções. São exemplos acordos firmados com instituições de pesquisa da Rússia e da Espanha, em cujos parques científicos a Universidade de Oxford abriu um escritório para auxiliar as empresas daqueles países a comercializar as tecnologias desenvolvidas em suas universidades.

27.7.1 Estímulo à competição

A criação de centros de empreendedorismo, mais do que um setor burocrático que visa apenas dar entrada em processos de pedidos de patentes, é um dos passos necessários para as universidades que querem copiar Stanford e o MIT. Além de todo o processo de pedido de patente e contatos com empresas interessadas em potenciais produtos desenvolvidos, esse centro organizaria eventos com a participação de empresários e ex-alunos que construíram suas próprias empresas para contar suas experiências como empreendedores. Afinal, nada melhor do que seguir modelos de negócios que deram certo. Nessa mesma linha de incentivo ao empreendedorismo, o centro promove competições que premiam as ideias mais promissoras dos estudantes. O MIT, por exemplo, distribui anualmente 350 mil dólares em prêmios para os alunos iniciarem empresas.

A Universidade de Aalto, na Finlândia, em 2009, tomando como modelo o MIT, deu início ao seu centro de empreendedorismo, colocando investidores em contato direto com professores e alunos e promovendo competições em busca de soluções ou aperfeiçoamento para suas demandas. Como resultado, empresas de tecnologia, como Nokia e Microsoft, doaram à Universidade um total de 18 milhões de euros no fim de 2009.

Como um filão na Finlândia é seu destaque no mercado de celulares, a Universidade de Aalto promove uma competição anual que dá prêmios de até 70 mil euros aos melhores aplicativos de alunos. O mesmo poderia ser desenvolvido pelas universidades brasileiras, atraindo talentos para os laboratórios de pesquisa e os preparando para o mercado de trabalho, além de atender às demandas de empresas interessadas, que financiariam os prêmios e futuras empresas. Um exemplo de aplicativos produzidos e utilizados em celulares que saíram de Aalto é o jogo para *smartphones Angry Birds*, dos fundadores da Rovio, que, desde 2009, foi baixado mais de 2 bilhões de vezes.

Para as universidades que partem do zero, reproduzir os modelos de Stanford e do MIT pode levar décadas. Contudo, exemplos demonstram que o investimento vale a pena, embora as universidades estejam atrasadas e os resultados possam demorar. Um exemplo é o Estado de Israel que, devido à sua necessidade de formar engenheiros para o Exército, começou nos anos 1980 a importar professores americanos.

Com a formação de engenheiros capacitados, multinacionais como a montadora General Motors e a fabricante de processadores Intel instalaram mais de 30 centros de pesquisa na nação israelense. Atualmente, o investimento

do governo nas universidades visando ao estímulo para o empreendedorismo chega a até 90% dos custos iniciais de *start-ups* criadas por alunos das universidades.

Com milhares de empresas formadas, os fundos de *venture capital* acabaram atraídos para a nação. Em 2013, Israel teve o maior índice de investimento de capital de risco *per capita* do mundo – 170 dólares, ante 75 dólares nos Estados Unidos.

Exemplos como o da Universidade Technion, no norte de Israel, onde os professores têm total liberdade para investir ou se aliar a alunos na criação de *start-ups*, transformaram a cidade de Haifa numa das regiões com maior atividade de inovação do mundo. Países como Chile e China começaram, desde 2009, a adotar iniciativas semelhantes.

27.7.2 Investimento privado

Fato foi que a crise mundial de 2008 promulgou uma crise de financiamento das universidades de pesquisa de todo o mundo, incluindo investimento público e privado. É histórico que o número de invenções em universidades, hospitais e instituições de pesquisa é ditado pelo ritmo de investimento público, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil. Nos demais países do BRICS e nas nações desenvolvidas, enquanto o número de invenções cresce, avançam também as patentes, os licenciamentos, as *start-ups* e os empregos. Segundo estudo da *Association of University Technology Managers* (AUTM), em 2010 foram registrados pelos seus afiliados valores da ordem de 2,4 bilhões de dólares com licenciamento de tecnologia. Embora a soma seja 3% superior aos dados de 2009, ela corresponde a um montante 30% mais baixo quando comparado com o ano de 2008, cujos valores somaram 3,4 bilhões de dólares em registros. As vantagens e interesses naturalmente devem destinar-se a ambos os lados, tanto empresas quanto universidades, sem deixar de lado o ator propulsor das ideias, o pesquisador. Benefícios existem para todos os envolvidos: a parceria dos laboratórios de pesquisas das universidades com as empresas é uma forma de partilhar custos em pesquisa e desenvolvimento em tempos de crise – o que tem sido uma necessidade principalmente para a indústria farmacêutica, carente de lançamentos de fármacos inovadores. Para as universidades e pesquisadores, há o retorno pelo licenciamento e *royalties* derivados da comercialização dos produtos gerados, além do fato de que a mão de obra especializada composta pelos alunos de mestrado e doutorado dos laboratórios de pesquisas

pode atuar diretamente na produção e comercialização nas empresas. Para o Estado, considerando que as universidades sejam públicas e possa haver o viés de que o financiamento da pesquisa é público, de modo que não poderia ser utilizado para interesses privados, há o retorno por meio da geração de empregos, de impostos e a criação de novos setores econômicos. De acordo com o estudo da AUTM feito com universidades afiliadas, a pesquisa patrocinada por empresas manteve-se estável entre 2009 e 2010, com investimentos na casa dos 4 bilhões de dólares, enquanto os fundos federais subiram de 33 bilhões para 39 bilhões de dólares.

No Brasil, em 2003, foi criada a Agência de Inovação Inova Unicamp, da Universidade Estadual de Campinas, que tem o papel de associar o trabalho de proteção de propriedade intelectual com a prospecção de parcerias com empresas. A grande diferença entre o Brasil e os Estados Unidos diz respeito à capacidade e experiência em inovação, tanto do meio empresarial como acadêmico. No Brasil, ainda são poucas as empresas que investem em pesquisa e desenvolvimento. Já nos Estados Unidos o foco em inovação das empresas é muito maior que aqui, e uma boa parcela da comunidade acadêmica está engajada na inovação tecnológica. Entre 1980 e 2005, a Unicamp foi a vice-líder no país em patentes, com 405 depósitos no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Só perdeu para a Petrobras, com 804 depósitos. Entre 2000 e 2011, celebrou 53 contratos de licenciamento de tecnologia, sendo 10 só no ano passado, tendo gerado 2 milhões de reais em *royalties* desde 2005. Ajudou a fechar mais de 300 projetos colaborativos com empresas, num total de 65 milhões de reais. Também mantém uma rede de relacionamentos, denominada Unicamp Ventures, composta por empresários, na maioria ex-alunos, fundadores de mais de 220 empresas com vínculo com a universidade. Esses empreendedores constituem atores imprescindíveis do ecossistema de inovação da região, trazendo oportunidades, orientação e financiamento no apoio à criação de empresas *start-ups*. Exemplo para que as demais universidades públicas brasileiras, que chegam a 54 federais, com 321 *campi*^{*}, e 3 estaduais de destaque, todas no estado de São Paulo, tomem iniciativas em prol do desenvolvimento científico, tecnológico e regional do Brasil.

* Disponível em: <http://painel.mec.gov.br/academico/mapaSupProf/acao/S>. Acesso em: 12 maio 2014.

REFERÊNCIAS

1. Vieira FV, Veríssimo MP. Crescimento econômico em economias emergentes selecionadas: Brasil, Rússia, Índia, China (BRIC) e África do Sul. *Economia e Sociedade* 2009; 18(3): 513-46.
2. Filho ETT, Puga FP. Investimento na economia brasileira: a caminho do crescimento sustentado. Rio de Janeiro: BNDES; 2007.
3. Fund IM. Slower growth in emerging markets, a gradual pickup in advanced economies. Washinton, DC: Update Weow; 2015.
4. Solow RM. A contribution to the theory of economic growth. *The Quarterly Journal of Economics*. 1956;70(1):65-94.
5. Development UNCTAD. Global value chains: investment and trade for development. 2013;236 p.
6. Bacha E. Os mitos de uma década: ensaios de economia brasileira. Rio de Janeiro: Paz e Terra. 1978.
7. Lederman D, Maloney WF. Does what you export matter? In search of empirical guidance for industrial policies. Washington, D.C.: International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank; 2012.
8. Technologies A. The state of the internet. 2nd quarter, 2015 report; 2015. 40 p.
9. Dutta S, Geiger T, Lanvin B. The global information technology report 2015. Geneva: World Economic Forum; 2016.
10. Neri M. Mapa da Inclusão Digital. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas; 2012.
11. Knight PT. A internet no Brasil. Insuficiência estratégica restringe o progresso. *Braudel Papers* 2013;(48).
12. McKINSEY&COMPANY. O ambiente empresarial no Brasil. Reflexões sobre a transformação nos últimos 25 anos e questões para a próxima década. 2013.
13. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Pedidos e concessões de patentes de invenção junto ao Escritório Americano de Marcas e Patentes (USPTO, na sigla em inglês), de países selecionados, 1999-2014. [Internet]. [Cited 2016 Jul 12]. Available from: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/342765.html>.
14. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasil: Comparação dos dispêndios em P&D (em valores de 2013) com o produto interno bruto (PIB), 2000-2013. [Internet]. [Cited 2016 Jul 13]. Available from: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/9138.html>.
15. Government of India. Department of Science & Technology. [Internet]. [Cited 2016 Jul 12]. Available from: <http://www.nstmis-dst.org/SnT-Indicators2011-12.aspx>.
16. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Dispendios nacionais em pesquisa e desenvolvimento (P&D), segundo setor de financiamento, países selecionados, 2012-2013. [Internet]. [Cited 2016 Jul 12]. Available from: <http://www.mct.gov.br/index.php/>

content/view/336712/Dispendios_nacionais_em_pesquisa_e_desenvolvimento_P_D_segundo_setor_de_financiamento_sup_1_sup__em_relacao_ao_produto_interno_bruto_PIB_paises_selecionados.html.

17. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Pesquisadores em pesquisa e desenvolvimento (P&D), em equivalência de tempo integral, em relação a cada mil pessoas ocupadas, de países selecionados, 2000-2013. [Internet]. [Cited 2016 Jul 12]. Available from: http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/338279/Pesquisadores_em_pesquisa_e_desenvolvimento_P_D_em_equivalencia_de_tempo_integral_em_relacao_a_cada_mil_pessoas_ocupadas_de_paises_selecionados.html.

18. Country note. Education at a Glance 2015: OECD Indicators – Brazil. [Internet]. [Cited 2016 Jul 12]. Available from: http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/education/education-at-a-glance-2015/brazil_eag-2015-46-en#page1.

19. Acemoglu D, Robinson J, Modenesi AM, Por que as nações fracassam: as origens do poder, da prosperidade e da pobreza: Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

20. Chen L. The world's biggest public companies 2015 Ranking. Forbes. 2015. [Internet]. [Cited 2016 Jul 12]. Available from: <http://www.forbes.com/sites/laurashin/2016/07/11/want-to-work-from-home-part-time-these-are-the-top-35-companies-hiring-so-far-in-2016/#697025414f2c>

SOBRE OS AUTORES

Abraham V. Schnaiderman

Drogaria Peralta (Coquimbo, Chile).

Adenise Lorenci Woiciechowski

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Adriane Bianchi Pedroni Medeiros

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Adriane Maria Ferreira Milagres

Professor, Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP).

Adriano A. Mendes

Professor adjunto. Laboratório de Bioprocessos, Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

Alessandra dos S. Tanajura

Lablaser, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Alexandre K. Guimarães

Lablaser, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Aline Brito Vaz

Doutoranda em Biotecnologia, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Aline Myuki Omori

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina.

Amanda Monteiro Elias

Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP).

Amélia R. Somensi Zeggio

Departamento de Informática, Centro de Tecnologia e Ciência da Computação, Universidade do Minho, campus de Gualtar (Braga, Portugal).

Anderson Fragoso dos Santos

Doutor do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Centro de Ciências da Matemática e da Natureza. Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

André Ballerini Horta

Doutorando em Agronomia (Proteção de Plantas), Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

André Luis Souza dos Santos

Professor associado, Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Centro de Ciências da Matemática e da Natureza. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Andrea Soares da Costa Fuentes

Professora adjunta, Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Antonio Carlos Siani

Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz.

Antonio Costa de Oliveira

Professor adjunto, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Genômica e Fitomelhoramento, Universidade Federal de Pelotas.

Antônio L. B. Pinheiro

Professor titular, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA). Responsável pelo Centro de Biofotônica, Faculdade de Odontologia, UFBA. Pesquisador do Instituto Nacional de Óptica e Fotônica

Ariel D. Arencibia

Investigador titular e professor adjunto. Escuela Ingeniería en Biotecnología. Universidad Católica del Maule. Avenida San Miguel 3605. Talca. Chile.

Benevides Costa Pessela João

Científico titular. Departamento de Biotecnologia e Microbiologia dos Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de los Alimentos (CIAL), Madrid, Espanha.

Carlos E. Salas

Professor associado, Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Carlos Ricardo Soccol

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Cátia Lacerda Sodré

Professora adjunta, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF).

Cesar Valmor Rombaldi

Professor titular, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Cínthia Caetano Bonatto

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília (UnB).

Cinthia de Carvalho Mantovani

Farmacêutica bioquímica, mestranda do Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas. Laboratório de Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

Claudia Masini d'Avila-Levy

Pesquisadora adjunta, Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Cláudio Nahum Alves

Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará (UFPA).

Clovis Ryuichi Nakaie

Professor doutor, Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Laboratório de Peptídeos e Polímeros.

Cristina M. Quintella

Professora doutora, Lablaser, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Cristine Rodrigues

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Darlan Gonçalves Nakayama

Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Denise Maria Guimarães Freire

Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Edna Maura P. de Araújo

Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

Edson Luiz Furtado

Professor titular, Laboratório de Patologia Florestal, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Bolsista CNPq.

Edson Luiz Lopes Baldin

Professor titular, Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Bolsista CNPq.

Eduardo Maffud Cilli

Professor adjunto do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP Araraquara). Laboratório de Síntese de Peptídeos.

Elba Pinto da Silva Bon

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Elisabete Yurie Sataque Ono

Professora associada, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina.

Elsa Uribe

Doutora, Departamento de Ingenieria de Alimentos, Universidad de La Serena, La Serena, Chile

Fabiana Diuk de Andrade

Pós-doutoranda, Laboratório de Ressonância Molecular Nuclear, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP).

Fernanda Ramlov

Núcleo de Produtos Naturais, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Flávio Duque Estrada Soares Pereira

Graduando de Biologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília (UnB).

Flavio Henrique Silva

Professor titular, coordenador do Laboratório de Biologia Molecular (LBM). Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Francieli R. Kulcheski

Laboratório de Genomas e Populações de Plantas, Centro de Biotecnologia e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Francieli Danubia Goelzer

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Francisco Menino Destéfanis Vitola

Doutorando em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Guita Nicolaewsky Jubilut

Professor doutor, Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Laboratório de Peptídeos e Polímeros.

Humbervânia R. G. da Silva

Lablaser, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Iúri Drumond Louro

MD, PhD, professor associado, Núcleo de Genética Humana e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Jaqueline Gozzi Bordini

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina.

Jerônimo Lameira Silva

Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA).

Jesus Davi Coral

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

José André Cavalcanti da Silva

Petrobras S. A., Centro de Pesquisas (CENPES), Lubrificantes e Produtos Especiais (Rio de Janeiro, RJ).

José Roberto Ernandes

Professor doutor, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP Araraquara). Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Leveduras.

José Rogério de Araújo Silva

Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará (UFPA).

Juceni P. David

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Júlia Pinto Piccoli

Mestranda, Laboratório de Síntese de Peptídeos, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP Araraquara).

Juliana de Oliveira

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Julio César de Carvalho

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Keli Cristina Alvim Sobral

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Lívia Tereza de Andrade Souza

Doutora em Bioquímica e Imunologia. Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia. Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Lizzy Ayra Pereira Alcântara

Pós-Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Luciana Malavolta

Professora assistente, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Luciana Porto de Souza Vandenberghe

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Luciane Dias Silva

Farmacêutica, mestranda do Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília (UnB).

Luciano Paulino Silva

Pesquisador, doutor, Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Lucimar Ferreira Kneipp

Pesquisadora associada, Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Luiz Alberto Colnago

Pesquisador titular, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP.

Luiz Alberto Junior Letti

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Luiz Eduardo da Rocha Pannuti

Doutorando em Agronomia (Proteção de Plantas), Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Luiz Guilherme P. Soares

Pós-doutorando – CAPES/PNPD na Área de Biofotônica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA). Pesquisador do Instituto Nacional de Óptica e Fotônica.

Maíra M. Tomazzoli

Núcleo de Produtos Naturais, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Marcelo Adriano Corrêa Maceno

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Marcelo Bellettini

Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Núcleo de Produtos Naturais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Marcelo Filonzi dos Santos

Farmacêutico bioquímico, mestre em Farmacologia e doutorando em Toxicologia. Laboratório de Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

Marcelo Maraschin

Professor doutor, Núcleo de Produtos Naturais, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Marcelo Matos Santoro

Professor associado (*in memoriam*), Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Margarete Kimie Falbo

Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Núcleo de Produtos Naturais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Maria Antonieta Ferrara

Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz.

Maria Beatriz Veleirinho

Núcleo de Produtos Naturais, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Marilena Meira

Professora doutora, Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, campus Simões Filho.

Mario Augusto Ono

Professor associado, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina.

Mario César Jucoski Bier

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Marta Helena Branquinha

Professora associada, Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Mauricio Yonamine

Professor associado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo (USP).

Melissa Tiemi Hirozawa

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina.

Michele Rigon Spier

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Miguel Rocha

Núcleo de Produtos Naturais, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Miriam T. P. Lopes

Professora associada, Laboratório de Substâncias Antitumorais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Newton Pereira Stamford

Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Paolla Mendes do Vale de Abreu

Doutoranda em Biotecnologia, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Patrícia Machado Bueno Fernandes

Professora associada, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Paulo F. de Almeida

Professor titular de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Responsável pelo Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos, UFBA.

Rafael Messias Gandra

Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Centro de Ciências da Matemática e da Natureza. Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

Railson Schreinert dos Santos

Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Genômica e Fitomelhoramento, Universidade Federal de Pelotas.

Raquel Spinassé Dettogni

Bióloga, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Núcleo de Genética Humana e Molecular, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Reinaldo Marchetto

Professor adjunto, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Rodolfo R. Guarín

Lablaser, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Rodrigo Ribeiro Resende

Professor adjunto, coordenador do Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Presidente do Instituto Nanocell.

Rogério Margis

Laboratório de Genomas e Populações de Plantas, Centro de Biotecnologia e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Rosália Rubel

Professora nas Faculdades Pequeno Príncipe (Curitiba, PR).

Sergio Luis Moreira Neto

Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP).

Shirley Schreier

Professora titular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

Simone K. Oliveira

Núcleo de Produtos Naturais, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Simone Santiago Carvalho de Oliveira

Doutora, Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Susan Grace Karp

Programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Positivo.

Suzan Cristina Rossi

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

Tania Sila Campioni

Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Doutora, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Thayza Christina Montenegro Stamford

Doutora, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco.

Vanessa Karine Schneider

Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Vanessa Lima Albernaz

Farmacêutica, mestranda do Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília (UnB).

Vanete Thomaz Soccol

Professor, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Vera Lúcia Perussi Polez

Pesquisadora, doutora, Laboratório de Metabolômica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Walter de Carvalho

Professor, Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP).

Weidson L. Silva

Lablaser, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

SOBRE A COLEÇÃO

BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE E AGRO&INDÚSTRIA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

Certa vez perguntaram-me “Por que fazer um livro de tamanha envergadura e alcance?”, mal sabia o colega cientista que seriam quatro livros... Nesta coleção a intenção foi reunir, em uma obra didática, sucinta e objetiva, os fatos mais novos na literatura com os conhecimentos clássicos dos temas disponíveis em obras separadas. Para se ter todo o escopo de Biotecnologia Aplicada à Saúde e Biotecnologia Aplicada à Agroindústria, dividimos o primeiro tema em três volumes e o segundo em um, totalizando quatro volumes, sendo que todos os tópicos são abordados nos cursos de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, dentre outros.

Ao todo, foram 74 autores no primeiro livro, 97 no segundo, 90 no terceiro, e 114 no quarto, totalizando 362 escritores, envolvendo professores/cientistas de referência nacional e internacional de 78 Laboratórios de Pesquisa diferentes, envolvendo mais de 150 Programas de Pós-Graduação do país, 49 Departamentos de 39 universidades, mais 27 institutos de pesquisas distintos. Praticamente, todos os Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia estão presentes nesta obra. O objetivo do livro, que é único no mercado, é justamente ter o maior público possível, alunos de pós-graduação e graduação. Há um tópico em cada capítulo que abordará os aspectos históricos e básicos de como se chegaram às técnicas e modelos apresentados, de extrema utilidade e didático para cursos de graduação, por isso envolvemos 69 instituições de ensino e pesquisa, de todos os estados do Brasil.

Seguindo nessa direção e no sentido de produção de um livro que seja tanto para o uso de alunos de graduação quanto para os de pós-graduação e para aqueles profissionais que queiram se introduzir na área de biotecnologia utilizando técnicas modernas e o uso com qualquer tipo de modelo celular, disponibilizamos, em um tópico de cada capítulo, as metodologias e procedimentos para a realização de experimentos. Um guia prático e simples para a bancada de experimentos complexos.

Prof. Rodrigo R. Resende (PhD)

Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia

Presidente da Sociedade Brasileira de Sinalização Celular

Presidente do Instituto Nanocell

Departamento de Bioquímica e Imunologia,

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais