



# **Biotecnologia e Produção de Alimentos**



# **Biotecnologia e Produção de Alimentos**

Anirene Galvão Tavares Pereira Ito

© 2018 por Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida ou transmitida de qualquer modo ou por qualquer outro meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia, gravação ou qualquer outro tipo de sistema de armazenamento e transmissão de informação, sem prévia autorização, por escrito, da Editora e Distribuidora Educacional S.A.

**Presidente**

Rodrigo Galindo

**Vice-Presidente Acadêmico de Graduação e de Educação Básica**

Mário Ghio Júnior

**Conselho Acadêmico**

Ana Lucia Jankovic Barduchi

Camila Cardoso Rotella

Danielly Nunes Andrade Noé

Grasiele Aparecida Lourenço

Isabel Cristina Chagas Barbin

Lidiane Cristina Vivaldini Olo

Thatiane Cristina dos Santos de Carvalho Ribeiro

**Revisão Técnica**

Rafael Bento Da Silva Soares

**Editorial**

Camila Cardoso Rotella (Diretora)

Lidiane Cristina Vivaldini Olo (Gerente)

Elmir Carvalho da Silva (Coordenador)

Letícia Bento Pieroni (Coordenadora)

Renata Jéssica Galdino (Coordenadora)

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Ito, Anirene Galvão Tavares Pereira  
189b Biotecnologia e produção de alimentos / Anirene Galvão  
Tavares Pereira Ito. – Londrina : Editora e Distribuidora  
Educacional S.A., 2018.  
192 p.

ISBN 978-85-522-0577-7

1. Biotecnologia. 2. Produção de alimentos. I. Ito, Anirene  
Galvão Tavares Pereira. I. Título.

CDD 553.7

---

Thamiris Mantovani CRB-8/9491

2018  
Editora e Distribuidora Educacional S.A.  
Avenida Paris, 675 – Parque Residencial João Piza  
CEP: 86041-100 – Londrina – PR  
e-mail: editora.educacional@kroton.com.br  
Homepage: <http://www.kroton.com.br/>

# Sumário

<b>Unidade 1   Introdução à biotecnologia</b>	<b>7</b>
Seção 1.1 - Princípios da biologia molecular	8
Seção 1.2 - Introdução às técnicas de biologia molecular	24
Seção 1.3 - Tecnologia de DNA recombinante	39
<b>Unidade 2   Tecnologia e biotecnologia de alimentos</b>	<b>57</b>
Seção 2.1 - Introdução à tecnologia de alimentos	58
Seção 2.2 - Biotecnologia de alimentos	71
Seção 2.3 - Aplicações tecnológicas e biotecnológicas nos alimentos e meio ambiente	84
<b>Unidade 3   Biotecnologia na indústria farmacêutica de medicamentos</b>	<b>101</b>
Seção 3.1 - Fundamentos biotecnológicos aplicados aos fármacos	102
Seção 3.2 - A produção de biofármacos	115
Seção 3.3 - Diversidade dos biofármacos e sua utilização	127
<b>Unidade 4   Biotecnologia e suas aplicações clínicas na genética forense</b>	<b>143</b>
Seção 4.1 - Vacinas, soros e kits diagnósticos	144
Seção 4.2 - Terapia gênica	158
Seção 4.3 - Genética forense	172



# Palavras do autor

Bem-vindo ao nanoscópico mundo da biologia molecular, capaz de expressar características macroscópicas que definem e diferenciam organismos.

Nossa disciplina de Biotecnologia e produção de alimentos apresentará toda a engenharia da célula responsável pela manutenção, evolução e diversificação da vida, e também como de posse desse conhecimento o homem consegue manipular as informações contidas nelas para conseguir produtos de interesse.

Esses produtos, por sua vez, têm sido desenvolvidos nas mais diversas áreas do conhecimento, permitindo avanços na área da saúde por meio do desenvolvimento de tratamentos para diversas enfermidades; no cenário agropecuário: a partir da produção dos emergentes organismos transgênicos, por exemplo; na indústria de alimentos e também no meio ambiente.

Com todo esse aprendizado, esperamos que você se torne apto a identificar e aplicar os princípios de biotecnologia no seu dia a dia de trabalho, desenvolvendo alimentos diferenciados, biofármacos para tratamentos e prevenção de doenças, inclusive aplicação de métodos genômicos, que permitem conhecer previamente as potenciais características que um organismo pode desenvolver, assim como toda a história e antecedentes que carrega em suas informações biológicas.

Mergulhe nestas páginas e passe a fazer parte deste futuro promissor e revolucionário.



## Introdução à biotecnologia

### Convite ao estudo

Olá aluno!

Iniciamos a primeira unidade dos nossos estudos e, aqui, veremos conceitos com os quais é mais familiarizado, como o processamento e a transmissão da informação genética pelo DNA. Novos termos, conceitos e técnicas também serão apresentados para seu conhecimento e reflexão com relação à manipulação do material genético: como ele pode ser extraído de células, ter suas regiões de interesse multiplicadas e, ainda, inseridas em outros organismos com o objetivo de obter produtos específicos, de interesse econômico e/ou para evolução e manutenção da saúde de organismos.

Você consegue imaginar como todo esse conhecimento aplicado pode revolucionar o mundo? Como podemos entender a expressão de nossas características em situações corriqueiras do dia a dia? Como nosso organismo responde a estímulos externos, a agentes infecciosos? Como tendem a se adaptar e sobreviver às respostas e tratamentos que damos a eles? Como foram selecionadas e direcionadas as maiores adaptabilidade e resistência de culturas agrícolas, além do maior desempenho de animais de produção?

O conhecimento da estrutura molecular no nível da informação genética de células procariontes e eucariontes já nos permitiu, e ainda nos permitirá, avanços incríveis nas mais diversas áreas do conhecimento.

Não fique fora dessa! Aprenda, aplique e faça a diferença no mundo.

# Seção 1.1

## Princípios da biologia molecular

### Diálogo aberto

Nesta seção realizaremos uma introdução à biotecnologia, tratando de seu conceito, suas classificações e aplicações. Em seguida, abordaremos as bases para o estudo dessa ciência com a apresentação da estrutura e das funções do DNA, como ele transmite suas informações para outras células a partir da replicação e como as características dos organismos são expressas pela síntese proteica e pelo controle da expressão gênica.

É muito importante o bom entendimento desses conteúdos para estudos futuros das modernas técnicas de biotecnologia empregadas atualmente.

Para começarmos, imagine a seguinte situação-problema: Daiane, apresentando sintomas de infecção bacteriana, como presença de febre, náuseas e vômito, decide esperar os sintomas passarem acreditando nas defesas do próprio corpo. No entanto, Daiane não apresenta melhora e decide procurar um médico, que a orienta a fazer uso de antibiótico para impedir a progressão da doença. Você, como farmacêutico, já pensou como as células microbianas podem ser afetadas por um medicamento? Pensando nos organismos unicelulares que podem ser patogênicos ao organismo humano, na maioria dos casos os antibióticos desenvolvidos são eficazes para controlar e acabar com a infecção, e existem diversos mecanismos de ação desses medicamentos sobre as bactérias. Com base no que estudaremos, consegue imaginar um deles? Como um conhecimento tão simples, como o da estrutura e funcionamento do DNA, permitiu uma revolução tão grande em nosso mundo?

### Não pode faltar

**Biотecnologia: histórico, conceito, princípios e aplicações na área farmacêutica**

Biотecnologia é a ciência que estuda as aplicações tecnológicas em sistemas biológicos, seres vivos ou parte deles, com o objetivo

de obter produtos de interesse (GASSEN, BONACELLI, SALLES-FILHO et al., 2000). Ela faz uso dos conhecimentos das áreas de Biologia, Química e Engenharia e, como disciplina de cursos de graduação, pode ser denominada ainda, Engenharia bioquímica ou Bioengenharia, apresentando aplicações práticas na área farmacêutica, médica, agricultura e ciência e tecnologia de alimentos.

Com uma tradição de mais de 10 mil anos na história da humanidade, a biotecnologia teve início com processos, hoje em dia, simples e consagrados, como a produção de pães, leites fermentados e cerveja. Tudo teve início com os, até então, ousados estudos de Louis Pasteur, que conseguiu meios estéreis de microrganismos indesejáveis, selecionando aqueles de interesse na produção de alimentos. Os agricultores também, mesmo sem saber, ao direcionarem os cruzamentos entre as melhores plantas, as mais resistentes, e os animais de melhor desempenho, realizavam a seleção genética dessas espécies por meio de cruzamentos, o que permitiu, por exemplo, a domesticação do milho há 12 mil anos na área central do México e a evolução das espigas e sementes desenvolvidas que conhecemos hoje em dia, diferenciadas com relação a outros cereais. Mesmo que não soubessem o que estava por trás da expressão de cada característica de interesse, eles as identificavam e procuravam mantê-las na população. Na medicina, o grande avanço da biotecnologia ocorreu com a produção de antibióticos utilizados nos tratamentos de infecções bacterianas. Alexander Fleming produziu a penicilina a partir de uma colônia de fungos e, desde então, ela passou a ser produzida em todos os países que tivessem um mínimo de conhecimento de técnicas fermentativas. Na era atual da biotecnologia, a produção de enzimas a partir de fungos e bactérias apresenta importantes aplicações em diversas indústrias: de alimentos e medicamentos a sabão em pó.



### Pesquise mais

Veja a interessante evolução das espigas de milho e outros vegetais neste link: Por alimentos mais artificiais. Disponível em: <<http://scienceblogs.com.br/rainha/2009/05/por-alimentos-mais-artificiais-i/>>. Acesso em: 2 out. 2017.

Esses exemplos se tornaram possíveis porque os biólogos Watson e Crick (1953) apresentaram a estrutura química do princípio hereditário, o ácido desoxirribonucleico, frequentemente abreviado como DNA,

presente em todas as células vivas. Estudos posteriores combinaram fragmentos de DNA de camundongos e bactérias e os viram serem replicados no microrganismo em que foram introduzidos (MORROW, COHEN, CHANG et al., 1974), permitindo a reprogramação de microrganismos, plantas e animais, com intervenções diretas nos códigos genéticos, de acordo com as necessidades da população. Os produtos farmacêuticos, como a produção laboratorial de insulina, foram os primeiros resultantes do conhecimento da modificação genética.

A partir do ano de 2005, conforme definido pelo 12º Congresso Europeu de Biotecnologia, os ramos da biotecnologia foram classificados por cores:

a) Biotecnologia branca – industrial – com aplicação nos processos industriais, como a manipulação biológica para a produção de um químico útil.

b) Biotecnologia vermelha – saúde – relacionada à cor do sangue, que gerou organismos capazes de produzir antibióticos e moléculas importantes em tratamentos de saúde, como a insulina.

c) Biotecnologia verde – agrícola – associada à cor da maioria das plantas, em que se destacam as cultivares de organismos transgênicos.

d) Biotecnologia azul – meio ambiente – que conta com pesquisas voltadas à manutenção do meio ambiente e remoção de contaminantes.

Na corrida biotecnológica, os Estados Unidos saíram na frente e permanecem como os pioneiros na detenção das técnicas moleculares, seguidos da Alemanha (GASSEN, BONACELLI, SALLES-FILHO et al., 2000).

No Brasil, a maioria dos cientistas se encontram nas instituições públicas de ensino, trabalhando em pesquisas e não em empresas privadas, o que resulta em menos investimento e, conseqüentemente, menos resultados aplicáveis quando comparados aos países que lideram o setor. O primeiro produto agrícola geneticamente modificado aprovado no país pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), em setembro de 1998, foi a soja transgênica *Roundup Ready* (RR), resistente ao herbicida glifosato e desenvolvida pela multinacional Monsanto. Na indústria farmacêutica, apesar de os medicamentos biológicos ainda representarem uma pequena parcela, apresentam também a maior taxa de crescimento, com destaque para as proteínas

terapêuticas, os anticorpos e as vacinas (GASSEN, BONACELLI, SALLES-FILHO et al., 2000).



Refleta

O cenário em nosso país mostra que, enquanto produtos da biotecnologia vermelha, que produzem medicamentos e tratamentos, são amplamente difundidos e aceitos pela população, garantindo benefícios à manutenção da saúde, a biotecnologia verde ainda é alvo de dúvidas e rejeição, e produtos transgênicos, como a soja e o milho, não são bem recebidos pelos consumidores. Em um cenário de crescimento populacional e consequente aumento da demanda por alimentos, como deve ser feito o debate para que sejam sanadas as dúvidas e as desconfiças em relação a essa tecnologia?

### **Estrutura de ácidos nucléicos. Organização gênica em procaríotos e eucariotos**

Hoje, a estrutura do DNA é bastante conhecida e estudada, correspondendo a uma molécula polimérica formada por unidades fundamentais de nucleotídeos.

Os nucleotídeos são monômeros, e não só do DNA; são encontrados na formação da molécula de RNA e livres na célula, desempenhando diversos papéis. Em sua composição química, podemos encontrar: um açúcar, ácido fosfórico e uma base nitrogenada, responsável pela variabilidade da molécula de DNA.

Existem quatro bases nitrogenadas na molécula de DNA: duas purinas, denominadas adenina (A) e guanina (G), e pirimidinas, que são as timina (T) e citosina (C).

A ligação entre os nucleotídeos para formar a molécula de DNA acontece através dos grupamentos fosfato, sendo denominada ligação fosfodiéster.

Não existe um limite da quantidade de nucleotídeos que podem se ligar e formar a molécula de DNA, muito menos para a ordem de ligação, podendo ser encontrados os grupos nitrogenados A, G, C ou T em qualquer posição da cadeia. Aí está a grande questão da variabilidade genética, uma vez que mesmo cadeias pequenas da molécula de DNA originam milhares de sequências diferentes, garantindo a diversidade entre e dentro das espécies.



## Exemplificando

Imagine uma cadeia relativamente pequena de DNA formada a partir da ligação de 10 nucleotídeos. Quantas sequências diferentes podem surgir? Se pensarmos na quantidade de nucleotídeos, pode parecer pouco, mas se fizermos as possíveis combinações das quatro bases nitrogenadas que compõem a molécula, temos:  $4^{10} = 1048576$ .

Nas células vivas, as fitas de DNA se organizam em pares, a partir da ligação de uma A com T e G com C, por meio de duas e três pontes de hidrogênio, respectivamente. Essa ligação acontece com sentidos inversos das cadeias, ou seja, enquanto uma sequência de nucleotídeos (polinucleotídeo) está na posição  $5' > 3'$ , o outro está na direção  $3' > 5'$ . A molécula adquire uma estrutura tridimensional a partir de giros para a direita, conhecida como dupla hélice, onde as bases nitrogenadas encontram-se empilhadas no interior da hélice.

O pareamento das bases é uma das características mais importantes da estrutura do DNA, pois fornece a sequência da molécula que é copiada durante a multiplicação celular.

Independentemente de se tratar de um organismo eucariontes ou procariontes, a informação biológica do material genético está contida nos genes, que são porções do DNA que contêm a receita para a produção de proteínas e expressão das características de cada organismo. A sequência dos nucleotídeos é a propriedade principal do gene, sendo responsável pela diversidade entre os organismos.

Somente uma das fitas da dupla hélice contém a informação biológica, também chamada de fita molde, que é lida na direção  $3' > 5'$ .



## Assimile

A capacidade dos genes de conter informações é praticamente ilimitada. Lembre-se de que um gene relativamente pequeno, com 100 pares de base (pb) de comprimento, por exemplo, pode apresentar qualquer uma das  $4^{100}$  combinações de nucleotídeos que serão lidos de formas diferentes.

Nas células eucariontes, o material genético encontra-se distribuído em poucos cromossomos, formados por uma longa molécula de DNA, que deve conter grande quantidade de genes, variando de milhares

a milhões, dependendo da espécie. Nos organismos procariontes, que diferem dos eucariontes fundamentalmente pela organização da célula, geralmente são unicelulares, com ausência de organelas e material genético não delimitado por uma membrana em um núcleo, normalmente apresentam um único cromossomo, assim, novamente uma grande quantidade de genes está presente em uma única molécula de DNA.

Nesses organismos, os genes podem ocorrer em grupos. Os óperons são característicos das bactérias e codificam uma série de proteínas diferentes que trabalham juntas em uma via metabólica integrada. As famílias multigênicas são encontradas em muitos organismos, também são genes correlacionados, porém, genes distintos possuem sequências de nucleotídeos idênticas ou similares. Eles podem ser classificados, ainda, em famílias multigênicas simples: nas quais todos os genes são exatamente idênticos, e isso é preciso quando a proteína que ele codifica é requerida em grandes quantidades pela célula; e famílias multigênicas complexas: formadas por genes semelhantes, mas não iguais.



### Assimile

Multigênicos simples: genes envolvidos na síntese de rRNA 5S componente dos ribossomos e requeridos em grande quantidade por praticamente todas as células.

Multigênicos complexos: a proteína globina nos vertebrados é formada por quatro cadeias,  $2\alpha$  e  $2\beta$ , que são codificadas cada uma por uma família de genes correlacionados que diferem um do outro em alguns aminoácidos da cadeia polipeptídica.

## Dogma central da biologia molecular: replicação do DNA

Tanto os organismos unicelulares quanto os pluricelulares têm suas células multiplicadas para produzir novos indivíduos no primeiro caso e novas células do organismo no segundo, por meio da replicação do material genético.

A questão é: como são formadas novas células a partir da replicação do DNA de forma que elas conservem ao máximo a identidade das células originais (parentais)?

No padrão geral de replicação do material genético, cada nucleotídeo da fita dupla de DNA atua como molde para a confecção de uma nova fita, gerando assim dois conjuntos de fitas complementares (A=T e C=G). O processo ocorre de forma semiconservativa, de forma que a molécula filha é constituída pelo filamento recém-produzido e uma fita da molécula original, o que foi comprovado por meio de um experimento conduzido por Meselson e Stahl (1958).

A replicação do DNA acontece em regiões limitadas da molécula que apresenta bases não pareadas, tendo início em uma posição denominada origem de replicação, e progride gradativamente ao longo da molécula. A enzima DNA polimerase atua nesses segmentos sintetizando o novo polinucleotídeo, na região agora denominada forquilha de replicação. Essa enzima curiosamente atua apenas no sentido 5' > 3' da fita de DNA.

Para melhor compreensão e conhecimento das enzimas que atuam no processo de replicação do DNA, bactérias servem como exemplo para o processo que pode ser dividido em três etapas:

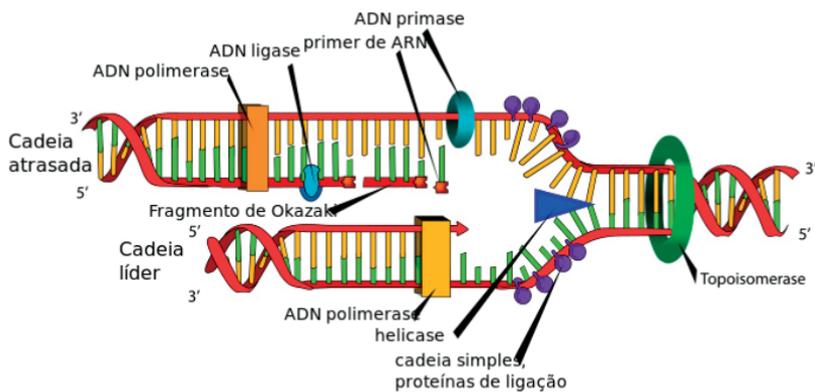
a) Separação da dupla hélice parental: os giros da dupla hélice são desfeitos pela ação de um conjunto de enzimas denominado DNA topoisomerases (tipo I-5', tipo I-3' e tipo II). A quebra das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas ocorre pela ação da enzima DNAB helicase, e os filamentos são mantidos separados através das proteínas de ligação unifilamentar (SSBs). Como resultado tem-se a forquilha de replicação que fornece os moldes para a DNA polimerase III.

b) Filamentos de replicação contínua (*leading*) e descontínua (*lagging*): como visto, a DNA polimerase só atua no sentido 5' > 3', o que significa que os filamentos molde precisam ser lidos no sentido 3' > 5'. Para uma das fitas, esse fato não constitui problema e a leitura é feita de forma contínua. Na outra fita, a cópia não pode ser feita de forma contínua e a replicação é feita em pedaços. Esses são denominados fragmentos de Okazaki e apresentam entre 100 e 1000 nucleotídeos de comprimento.

c) Iniciação e união dos fragmentos e Okazaki: a DNA polimerase III começa a agir a partir de uma pequena estrutura iniciadora de ribonucleicos colocados no início do segmento contínuo ou descontínuo por uma RNA polimerase. No filamento descontínuo, a DNA polimerase III pode sintetizar DNA apenas por determinada

distância, até atingir o RNA iniciador da extremidade 5'. Nesse ponto, a enzima para e entra em ação uma DNA polimerase I, que continua o processo de replicação e ainda tem a capacidade de remover os filamentos iniciadores de ribonucleotídeos do fragmento adjacente, substituindo-o por desoxirribonucleotídeos. A união dos vários filamentos de Okazaki originados ocorre por ligação fosfodiéster catalisada pela DNA ligase.

Figura 1.1 | Esquema da replicação do DNA



Fonte: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Helicase#/media/File:DNA\\_replication\\_pt.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Helicase#/media/File:DNA_replication_pt.svg)>. Acesso em: 30 ago. 2017.



## Exemplificando

Para facilitar a compreensão do processo de replicação do DNA, assista aos vídeos disponíveis nos seguintes links:

- Animação sobre a Replicação do DNA. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=T3RK7w0nfOc>>. Acesso em: 2 out. 2017.
- Estrutura e replicação de DNA. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=34Jr2U7KwOE>>. Acesso em: 2 out. 2017. Esse último também apresenta a formação da estrutura da molécula de DNA.

A replicação é concluída com a revisão dos filamentos formados pelas próprias DNA polimerases, a fim de substituir um nucleotídeo incorreto, porém alguns erros podem persistir. Em alguns casos eles não provocam alteração na proteína por codificar o mesmo aminoácido; em outros, podem tornar a proteína inativa ou até mesmo

interferir negativamente no organismo; e em raros casos podem trazer vantagens que tornam o organismo mais apto e por isso se mantêm nas gerações futuras. e, por fim, algumas mutações são benéficas, criam organismos melhores e mais adaptados e por isso mantêm-se nas gerações futuras.

## **Síntese de RNA, código genético e síntese de proteínas**

Você sabia que mais de um tipo de RNA participa dos processos de produção de proteínas nas células procariontes e eucariontes? Os principais são: rRNA ou ribossomal, tRNA ou transportador e mRNA, também denominado mensageiro. Os dois primeiros são definidos como estáveis por serem produtos finais da expressão gênica e apresentarem função de RNA na célula, participando do processo de tradução, enquanto o mensageiro é produzido quando processos de síntese de proteínas são demandados pela célula, atuando como intermediários à expressão gênica e, por isso, tendo um tempo de vida mais curto. Essas moléculas são responsáveis pela síntese proteica nas células, a partir da informação contida no DNA.

O que basicamente os diferencia da molécula de DNA, além da função exercida na célula, é a presença de cadeia única em cada molécula, a substituição da base nitrogenada timina (T) por uma uracila (U) e o tamanho de suas moléculas bastante inferior às de DNA.

Os nucleotídeos formadores da molécula, por sua vez, são constituídos por uma base nitrogenada, um grupo fosfato e um açúcar, nesse caso, uma ribose. Sua cadeia se dobra formando diferentes estruturas tridimensionais a partir do pareamento de bases da mesma fita.

A síntese dessas moléculas é catalisada por uma enzima chamada RNA polimerase, que usa a fita de DNA como molde em um processo denominado transcrição. A molécula de DNA abre-se em regiões específicas dos genes que contêm informação para a síntese desses polinucleotídeos e a RNA polimerase progride pela molécula no sentido 3' ao 5'.

O mRNA contém o código genético, ou seja, a informação para a síntese de proteínas determinada pela relação entre a sequência de bases do DNA e a sequência dos aminoácidos nas cadeias proteicas, que, por sua vez, expressam as características específicas de cada indivíduo.

As informações contidas nessa molécula são lidas na maquinaria biológica dos ribossomos, grandes estruturas moleculares formadas pelo rRNA e cadeias polipeptídicas, em que o tRNA – que recebe esse nome por transportar os aminoácidos até os ribossomos, permitindo que eles se unam formando as proteínas – participa do processo conhecido como tradução. A leitura do mRNA é feita a cada trinca de bases (códon) que contém informação para adição de um aminoácido à cadeia polipeptídica. Assim, cada tRNA contém um anticódon correspondente ao códon do mRNA e que transporta um aminoácido específico, dentre os 20 existentes na natureza.

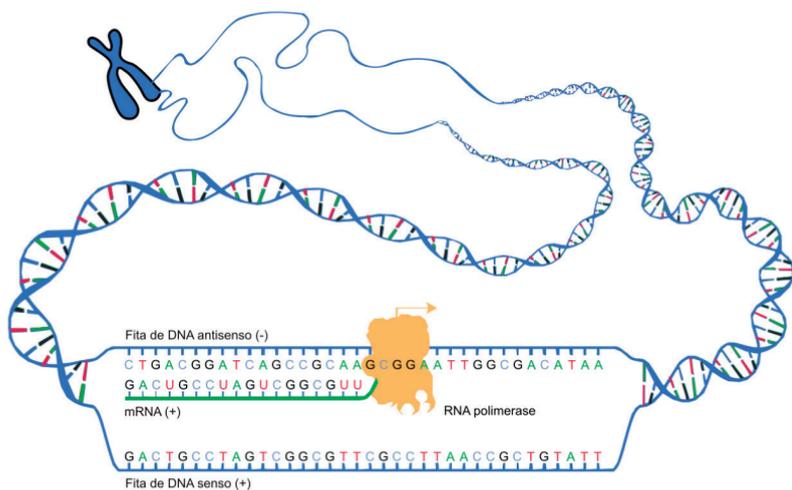


### Exemplificando

Ao códon AUG de um mRNA encaixa-se o anticódon UAC de um tRNA, que transporta o aminoácido metionina a ser adicionado à cadeia proteica.

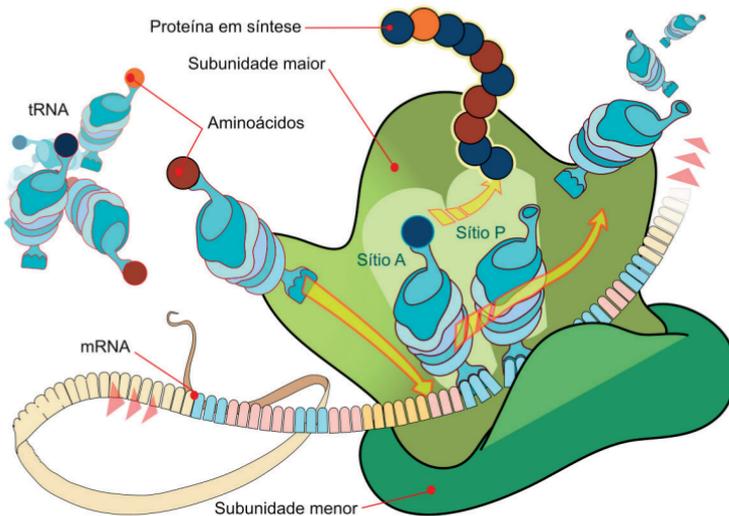
Existem códons iniciadores, normalmente a primeira trinca AUG que o ribossomo *escaneia*, e finalizadores (UAA, UAG ou UGA), que o tRNA interpreta como pontos inicial e final para a síntese de proteínas.

Figura 1.2 | Processo de transcrição do mRNA



Fonte: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Transcri%C3%A7%C3%A3o\\_de\\_DNA.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Transcri%C3%A7%C3%A3o_de_DNA.svg)>. Acesso em: 30 ago. 2017.

Figura 1.3 | Processo de tradução



Fonte: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Ribosome\\_mRNA\\_translation\\_pt.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Ribosome_mRNA_translation_pt.svg)>. Acesso em: 30 ago. 2017.



**Assimile**

Toda a informação para a síntese proteica está contida no DNA e é transmitida, reproduzida e traduzida como polipeptídeo pelos RNAs. Esse é o resumo do dogma central da biologia, que explica o fluxo de informações por meio do código genético. Esse, por sua vez, ainda apresenta a característica de ser degenerado, o que significa que todos os aminoácidos, exceto metionina e triptofano, são codificados por mais de um códon.

## Controle da expressão gênica em procaríotos e eucaríotos

Algumas proteínas são requisitadas a todo tempo para manutenção e funcionamento das células, por isso seus genes são ativos ou expressos e passam por processo de transcrição e tradução continuamente, sendo chamados de genes de manutenção. Muitos outros traduzem proteínas especializadas que são necessárias somente sob circunstâncias especiais e, por isso, não são produzidas de forma contínua. O fato de determinados genes se expressarem a todo tempo nas células, e outros não, faz parte de uma complexa organização celular denominada controle da expressão gênica, que, em outras

palavras, significa controlar quando esses genes permanecem “ligados” e “desligados”.



Reflita

Você já parou para pensar por que as células não expressam todos os seus genes a todo tempo para sempre terem um suprimento de proteínas/enzimas, independentemente das condições às quais são submetidas?

De forma geral, o controle da expressão gênica ocorre de forma semelhante em procariotos e eucariotos e pode ser dependente de estímulos do meio, os quais fazem com que a célula altere suas capacidades bioquímicas, no entanto, esse controle nos organismos eucariontes é mais sofisticado. Os estágios de desenvolvimento do organismo também influenciam na expressão de alguns genes, tendo na produção da enzima lactase um ótimo exemplo, por ser produzida nos recém-nascidos de mamíferos e apresentar redução da expressão com o desenvolvimento do organismo, em outras palavras, pela menor necessidade da ingestão de leite, podendo desenvolver, inclusive, a intolerância adquirida à lactose.

A regulação gênica em organismos multicelulares promove o desenvolvimento de células especializadas, uma vez que os genes expressos no fígado, por exemplo, são para desenvolver funções totalmente diferentes das células musculares estriadas.

Ainda não se sabe exatamente como é realizada a regulação da expressão gênica, mas a resposta está em exercer algum controle sobre a via de produção das proteínas.

Isso pode acontecer por meio de alterações na transcrição, que podem ocorrer diretamente na identificação das regiões promotoras pela RNA polimerase, já que, com menos moléculas transcritas, haverá menos produtos gênicos, e o inverso também é verdadeiro. A taxa de degradação do mRNA também parece ser alvo de controle, influenciando a expressão gênica de forma semelhante à quantidade de transcritos. Além disso, alterações na estrutura dessa molécula levam à sua indisponibilidade para a tradução. Um controle direto na tradução, sobre a quantidade de ribossomos disponíveis para traduzir os mRNA, também é mecanismo de controle adotado pela célula para regular a expressão gênica.

Somando-se aos processos de transcrição e tradução celular, em que atuam as moléculas de RNA e, portanto, alvos de controle da expressão dos genes, o número de cópias de um gene no genoma influencia diretamente na quantidade de proteína traduzida. Maior quantidade de DNA molde gera maior quantidade de mRNA por transcrição, além de valores mais altos da respectiva proteína por tradução. Dessa forma, proteínas requeridas sempre ou em maior quantidade nas células podem apresentar mais de um gene nos cromossomos que contêm o código para traduzi-las.



### Pesquise mais

Para entender melhor como funcionam os complexos mecanismos de controle da expressão gênica, veja as páginas 3 a 4 e 6 a 12 do material *Regulação Gênica em Bactéria*. Disponível no link (de livre acesso) a seguir: <[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3005481/mod\\_resource/content/1/BiologiaMolecular\\_texto08%20%285%29.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3005481/mod_resource/content/1/BiologiaMolecular_texto08%20%285%29.pdf)>. Acesso em: 23 dez. 2017. De forma semelhante a outros estudos, os de controle gênico tiveram início nos organismos mais simples e podem ser extrapolados para organismos mais complexos, como os policromossômicos e multicelulares.

Esse estudo do *operon Lac* foi realizado em bactérias *E. coli* a partir de um mRNA que transcreve três genes codificadores de proteínas, encontrados em sequência e que atuam no metabolismo da lactose. Quando a bactéria é colocada em um meio sem glicose, mas na presença de lactose, a concentração dessas três enzimas aumenta grandemente. A partir desse conhecimento, foram criados mutantes para cada um desses genes, que não produziam a forma ativa da enzima. A maior descoberta foi que alguns mutantes continuaram a produzir as três enzimas mesmo na ausência do estímulo externo (meio com lactose) e, ao mesmo tempo, apresentavam uma mutação em outro gene (I) próximo ao *operon Lac*. Então, diversos testes foram realizados combinando a mutação desse gene I com as mutações dos genes codificadores das enzimas em meios que induziam ou não a tradução das proteínas. A conclusão foi que o gene I sem mutação apresentava controle sobre a tradução das enzimas em ausência de estímulo, porém, com a mutação, perdia essa capacidade, e os genes do *operon Lac* apresentavam expressão, mesmo na ausência de lactose.

Com a conclusão do Projeto Genoma Humano e a identificação das regiões intergênicas (introns) sem função aparente nas células, acreditava-se que eram genes que perderam sua função no organismo no decorrer da evolução. Hoje, sabe-se que essas regiões podem ser as responsáveis pelo controle da expressão gênica, como o gene *I* sobre o *óperon Lac*, principalmente porque contêm sítios de ligação para reconhecimento indireto das condições ambientais e, assim, podem ligar e desligar a maquinaria de produção de proteínas.

## Sem medo de errar

Diante do conhecimento apresentado e refletido por nós, já temos condições de discutir as questões propostas, não é mesmo? Então, vamos juntos!

Daiane, inicialmente, não procurou um médico e acreditou que poderia superar a infecção bacteriana sem a necessidade do uso de medicamentos, pois ela sabe que possui genes ativos codificadores de proteínas específicas nas células de defesa, mais conhecidas como glóbulos brancos, que perante a entrada de um patógeno no organismo humano, em outras palavras, um estímulo externo, inicializam o processo de defesa e “ataque” contra ele. Essas células, por sua vez, também podem aumentar em quantidade, dependendo da extensão da infecção, e, para isso, precisam replicar o material genético, DNA, e assim podem formar novas células.

Ao mesmo tempo, a bactéria, organismo procaríoto unicelular, também faz uso da replicação do DNA para formar novos indivíduos, fato que pode aumentar significativamente a contaminação e/ou infecção em um curto espaço de tempo, já que são organismos que, normalmente, apresentam apenas um cromossomo.

A replicação gênica é importante para entendermos a multiplicação celular, mas, como vimos, a infecção não cedeu e o médico indicou um antibiótico, no caso, uma fluoroquinolona. E agora? No que o conhecimento sobre expressão gênica nos ajuda a entender o tratamento indicado?

Para entendermos a questão da ação dos antibióticos sobre microrganismos patogênicos, existem dois mecanismos fundamentados nos conhecimentos que adquirimos até agora.

O primeiro deles está diretamente associado a impedir a reprodução do microrganismo por meio de ação direta na replicação do DNA. Sem DNA replicado, não há como formar novas células. É o caso das fluoroquinolonas, que agem inibindo a DNA girase e a topoisomerase IV, impedindo, assim, a replicação celular nas bactérias.

Um segundo possível mecanismo atua no controle da expressão gênica, impedindo a transcrição do DNA em mRNA ou a formação dos ribossomos bacterianos, bloqueando a síntese das proteínas microbianas com a consequente morte desses organismos.

Como vimos, conhecer as bases moleculares do funcionamento celular é importante para o entendimento de todo o processo de sinalização, replicação e, também, para a prática, tanto na atuação mais clínica quanto nas técnicas que podem ser utilizadas no dia a dia da prática farmacêutica.

## Faça valer a pena

**1.** A molécula de DNA se organiza nas células em cromossomos e, em sua extensão, são encontradas as unidades fundamentais que contêm a informação genética, os genes – que são responsáveis pelas características específicas de cada espécie e de cada organismo, inclusive diferenciando indivíduos dentro de uma mesma espécie.

Com base no seu conhecimento sobre a estrutura do DNA e a função dos genes, escolha a alternativa que explica por que a capacidade do gene em conter informação é quase ilimitada.

- a) Existem, pelo menos, dois tipos de genes para cada característica expressa nos organismos vivos.
- b) A estrutura do DNA diverge em função da espécie.
- c) A informação do gene depende da quantidade e sequência das bases nitrogenadas, produzindo, dessa forma, de milhares a milhões de sequências diferentes.
- d) Os genes são diferentes entre diferentes organismos.
- e) Nas células eucariotas existe mais de um cromossomo, cada um deles contendo milhares de genes e todos diferentes entre si.

**2.** As moléculas de DNA e RNA, responsáveis por armazenar e transmitir informação genética, respectivamente, são polímeros de nucleotídeos, que apresentam uma formação básica que contém uma base nitrogenada, um açúcar e um grupo fosfato. Porém, apesar dessas semelhanças, as

duas moléculas também apresentam diferenças quanto a suas funções e estruturas.

Sobre as funções e estrutura das moléculas de DNA e RNA, assinale a alternativa correta:

- a) As duas moléculas encontram-se nos núcleos das células na forma de dupla hélice.
- b) Na molécula de RNA a base nitrogenada uracila aparece em substituição à timina.
- c) As células vivas sempre apresentam concentrações constantes das moléculas de DNA e RNA.
- d) O DNA e o mRNA armazenam informação genética.
- e) O RNA contém todos os genes da fita molde de DNA.

**3.** O mecanismo de controle da expressão gênica, responsável por ligar e desligar os genes de acordo com a necessidade de suas proteínas na célula, ainda não é totalmente elucidado pela comunidade científica, mas muitas etapas do processo de produção das proteínas são apontadas como influenciadoras.

Entre as alternativas a seguir, marque aquela que apresenta um processo celular associado ao controle da expressão gênica.

- a) Disponibilidade de aminoácidos livres na célula.
- b) Atividade da enzima DNA polimerase.
- c) Taxa de replicação do material genético.
- d) Sequência de bases nitrogenadas da molécula de DNA.
- e) Taxa de degradação do RNA mensageiro.

# Seção 1.2

## Introdução às técnicas de biologia molecular

### Diálogo aberto

Caro aluno,

De posse do conhecimento da estrutura, função e ação do material genético, passaremos a estudar agora as técnicas utilizadas na extração, separação e manipulação do DNA, que permitem à comunidade científica e industrial chegarem à formação de produtos de interesse, assim como técnicas mais avançadas de sequenciamento, que geram conhecimento capaz de detectar características específicas de cada organismo, tipos de genes e proteínas por eles produzidas, tendências a determinadas doenças e, dessa forma, permitem o desenvolvimento de tratamentos específicos e mais eficientes.

A manipulação do DNA é o ponto inicial para os grandes avanços que buscamos e os que já conseguimos atualmente, por isso deve ser feita de modo a se obter os mais puros e precisos resultados.

Para iniciarmos nosso estudo, avalie a seguinte situação, ainda referente à contaminação de Daiane por um agente infeccioso:

Após os sete dias de tratamento com antibiótico, Daiane não percebe melhora dos sintomas da infecção e decide voltar ao médico, que, percebendo a ineficácia do medicamento prescrito, solicita testes laboratoriais (genéticos) para identificação do microrganismo que a infectou. Entre os métodos diagnósticos, como a metodologia PCR pode auxiliar a análise? Como é feita a preparação do material genético para esse tipo de procedimento? Em caso de diagnóstico inconclusivo, quais outras tecnologias poderiam auxiliar o médico na identificação do patógeno?

### Não pode faltar

#### Métodos de purificação de ácidos nucleicos

Após conhecermos o funcionamento do material genético e como ele se expressa nos organismos vivos determinando suas características,

é de interesse conhecer técnicas de análise e manipulação dessa poderosa molécula, certo?

A extração e purificação dos ácidos nucleicos são as primeiras etapas a serem realizadas independentemente do que se deseja analisar. Fala-se em ácidos nucleicos porque a maioria das técnicas os extrai, ou separa do restante da célula, tanto DNA quanto RNA, e, dependendo do objetivo da análise, eles devem ser separados entre si.

Normalmente existem kits comerciais que contêm os reagentes empregados nesses procedimentos, e cada um deles apresenta sensibilidade de detecção diferente.

A escolha de um kit de extração e purificação de ácidos nucleicos deve levar em consideração a origem da amostra, de onde foi extraída e a quantidade disponível; o método de preparação das amostras; a intenção de uso do DNA; o conteúdo húmico que são os produtos da decomposição microbiana de matéria orgânica; a simplicidade do protocolo e habilidade de automatizar a extração.



### Exemplificando

Dentre os fatores aqui mencionados, a origem do material genético pode ser de amostras de sangue, bulbo capilar, entre outros. Elas, por sua vez, podem ter sido preparadas como *pellets* celulares frescos ou congelados ou até células fixadas em etanol, já que o álcool mantém a qualidade do DNA e não apresenta afinidade por ribonucleotídeos de RNA. O objetivo da extração do DNA também deve ser levado em consideração, pois a qualidade e pureza do material são exigidas em diferentes graus entre uma análise de PCR, sequenciamento e expressão gênica, por exemplo. Amostras que possivelmente apresentem conteúdo húmico, como esterco e adubo, devem passar por um processo de remoção dessas substâncias que podem influenciar na pureza do material obtido.

Independentemente do kit empregado, da origem da amostra e do objetivo da análise, a extração dos ácidos nucleicos é realizada em cinco etapas.

A primeira delas compreende a lise celular, ou seja, o rompimento da célula por métodos químicos ou físicos para acessar o DNA. Em seguida, os lipídios, especialmente os de membrana, são removidos com o uso de detergentes, como SDS, e por centrifugação; por

sua vez, a remoção das proteínas do extrato celular é feita a partir de desnaturação proteica, por ação de proteases, e separação por centrifugação e/ou filtração. No entanto, a remoção do RNA é uma etapa opcional na maioria dos kits, totalmente dependente do objetivo da análise e, quando necessária, ocorre pela adição de enzima RNase, que quebra a molécula em subunidades ribonucleotídeas. Por fim, os ácidos nucleicos de interesse são extraídos com fenol, precipitados por ultracentrifugação ou métodos cromatográficos (troca iônica, filtração em gel), agregados e diluídos normalmente em etanol.

O que caracteriza especificamente essas metodologias é o fato de a extração orgânica usar solventes orgânicos como fenol e clorofórmio para a extração do DNA; que apresentam desvantagens, como o fato de serem compostos perigosos ao manuseio e o risco de contaminação da amostra por resíduos dos próprios solventes. A extração em sílica é fundamentada em separação física, em que o DNA é adsorvido em partículas de sílica formadoras de membranas e superfícies, posteriormente transferido em solução tampão com baixa concentração de sal. Essa metodologia permite aplicação em colunas e microchips, simplificando o processo; a separação magnética se torna possível pela ligação da molécula de DNA a partículas ou grânulos magnéticos revestidos com um anticorpo que permite a ligação. O processo pode ser automatizado, porém a metodologia é mais cara quando comparada às demais. Por fim, a tecnologia de troca iônica se baseia na interação dos grupos fosfato carregados negativamente com a superfície de um substrato positivo; o material celular é separado por uma sequência de lavagens com solução tampão com baixo teor de sal, e o DNA, diluído em tampão com alto teor salino.

### **Separação eletroforética e hibridização de ácidos nucleicos**

A separação eletroforética é aplicada às moléculas de DNA e/ou RNA já extraídas e separadas do conteúdo celular, bem como permite a avaliação de cada uma delas.

Nesse processo, a separação de moléculas carregadas, como os ácidos nucleicos e proteínas, torna-se possível pela passagem de um campo elétrico. Uma vez que as moléculas de DNA apresentam carga negativa, deslocam-se em direção ao polo oposto; para isso, a amostra é colocada em uma estrutura de suporte, imersa em solução tampão e disposta em uma cuba que contém os eletrodos responsáveis pela passagem de corrente elétrica.



1) Meios de suporte: papel filtro, membrana de celulose, gel de agarose, membrana de poliacrilamida.

2) Meios tamponantes: TAE – Tris, acetado e EDTA, e TBE – Tris, borato e EDTA.

A escolha depende de uma série de fatores, que vão desde o tipo e conformação da molécula que se deseja separar até a eficiência e especificidade dos reagentes.

O vídeo disponível no link a seguir apresenta um exemplo de separação eletroforética de DNA em gel de agarose. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=vL3Efrx78P0>>. Acesso em: 11 out. 2017.

A velocidade de deslocamento é dependente das cargas e do tamanho das moléculas; a intensidade da corrente, a conformação do DNA e a concentração de agarose, quando se trabalha com o gel, que determinarão o diâmetro dos poros, fazendo com que moléculas de propriedades diferentes se desloquem de formas distintas e, assim, sejam diferenciadas entre si.

Existem protocolos de separação eletroforética (testados e consagrados nos laboratórios da área) que combinam as melhores características de cada etapa do processo com vistas a otimizá-lo.

Juntamente à separação eletroforética, pode ser realizada a hibridização dos polímeros de nucleotídeos, que consiste em utilizar uma fita simples da molécula de DNA obtida por desnaturação e renaturação das cadeias complementares, ou o RNA, como sonda genética, para localizar um gene ou molécula em célula ou tecido, assim como identificar aqueles expressos e não expressos nas células, bem como variantes/alterações genéticas.

A fita única liga-se sequencialmente com sondas marcadas por radioatividade, quimioluminescência ou por um anticorpo, que contém uma sequência inicial de nucleotídeos específica a cada fragmento de DNA ou RNA que se deseja avaliar. A molécula então passa por hibridização, que consiste em ser adicionada de nucleotídeos complementares à fita.

Na hibridização do DNA por *Southern-blot*, fragmentos de DNA, obtidos por endonucleases de restrição (vamos ver a seguir) e separados por eletroforese, são imobilizados em uma membrana de nitrocelulose ou náilon; uma sonda de DNA radioativa, contendo a sequência de interesse, é hibridizada com o DNA imobilizado na membrana que contém sequência complementar a ela; em seguida, a membrana é lavada para a retirada das sondas não hibridizadas e exposta a um filme radiográfico para detectar a radioatividade, e só serão detectadas sondas hibridizadas pela sequência específica do fragmento de DNA que se deseja identificar. Assim, algumas amostras apresentam resultado negativo simplesmente porque não contêm a sequência de DNA em estudo.

O método é bastante utilizado em diagnósticos moleculares.



### Pesquise mais

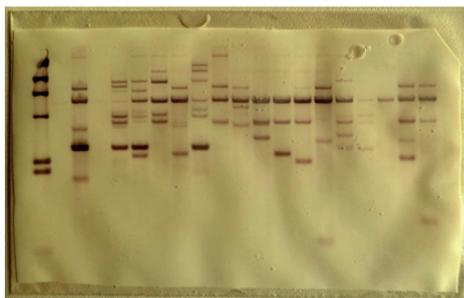
Conheça também as técnicas Northern Blotting e Western Blotting, que apresentam o mesmo princípio de hibridização aplicado à mRNA e proteína, respectivamente, sendo utilizadas principalmente nos estudos de expressão gênica e identificação de proteínas. Acesse os links sugeridos a seguir.

Disponível em: Northern Blot <<http://knoow.net/ciencterravida/biologia/northern-blot/>>. Acesso em: 8 out. 2017.

Disponível em: Western Blot <<https://www.youtube.com/watch?v=46NnUeewmbM>>. Acesso em: 8 out. 2017.

A figura a seguir mostra o resultado desses tipos de análises pela separação dos polímeros de nucleotídeos como diferentes bandas no suporte, deslocadas de acordo com a carga que apresentam (em sentido igual ou diferente ao da corrente elétrica) e separadas por seus tamanhos. Moléculas menores apresentam maior facilidade de passagem pelos poros do gel e por isso apresentam maior deslocamento.

Figura 1.4 | Membrana de um Southern blot após hibridização e separação



Fonte: <<https://goo.gl/xrJDst>>. Acesso em: 14 set. 2017.

Cada uma das bandas visualizadas na figura representa um fragmento de DNA hibridizado de tamanho molecular diferenciado.

### Enzimas utilizadas na manipulação in vitro de ácidos nucleicos

A descoberta das enzimas denominadas endonucleases de restrição permitiu aos cientistas a manipulação do DNA em laboratório para obtenção de fragmentos de interesse. Essas enzimas existem naturalmente nos organismos e atuam como proteção das células, clivando ou quebrando DNAs invasores.

Esse mecanismo é possível uma vez que as endonucleases de restrição são sítio-específicas, ou seja, são capazes de identificar determinada sequência de nucleotídeos e agir sobre ela, sendo denominadas enzimas de restrição tipo II. A propriedade de reconhecimento da sequência nucleotídica independe da origem do DNA, e diferentes endonucleases são produzidas por diferentes microrganismos. Veja no quadro a seguir alguns tipos dessas enzimas de restrição, organismo de origem, denominação e sequência nucleotídica em que atuam.

Quadro 1.1 | Enzimas de restrição

Enzimas	Organismo fonte	Sítio de restrição de DNA bifilamentar	Estrutura dos produtos cortados
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	$  \begin{array}{c}  5'-G-A-A-T-T-C \\  \swarrow \quad \searrow \\  C-T-T-A-A-G-5'  \end{array}  $	$  \begin{array}{l}  -G \quad 5' A-A-T-T-C- \\  -C-T-T-A-A- 5' \quad G-  \end{array}  $
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	$  \begin{array}{c}  5'-C-T-G-C-A-G- \\  \swarrow \quad \searrow \\  -G-A-C-T-C-5'  \end{array}  $	$  \begin{array}{l}  -C-T-G-C-A 3' \quad G- \\  -G \quad 3' A-C-G-T-C-  \end{array}  $

Smal	<i>Serratia marcescens</i>	5'-C-C-C-G-G-G -G-G-G-C-C-C	-C-C-C -G-G-G	G-G-G C-C-C
------	----------------------------	--------------------------------	------------------	----------------

Fonte: adaptado de <<https://goo.gl/VfjTw2>>. Acesso em: 12 set. 2017.

Duas particularidades merecem nossa atenção: perceba que a enzima não tem preferência de corte pelo sentido 5' ou 3' e também não corta as fitas complementares do DNA nos mesmos pontos, o que gera fragmentos com diferentes nucleotídeos.

Os fragmentos de DNA formados podem seligar, independentemente da origem da molécula, porque todos têm terminações com apenas um filamento; terminações complementares por ligações de hidrogênio e, existindo condições adequadas para a renaturação, a enzima DNA ligase reconstrói as ligações fosfodiéster faltantes em cada filamento.



### Assimile

Fragmentos de DNA formados pela ação de endonucleases de restrição podem ligar-se novamente entre si e/ou entre fragmentos de diferentes origens (cromossomo, espécie), formando uma nova fita. Esse fato é importante porque a partir desse conhecimento foi possível a manipulação do DNA em laboratório – in vitro – e o desenvolvimento das modernas técnicas de DNA recombinante que veremos mais adiante.

## Reação em cadeia da polimerase – PCR

Vamos continuar nossos estudos observando uma questão importante: quantidade de amostra. Tanto para enxergarmos num gel de agarose quanto para isolarmos uma determinada região do DNA, precisaremos de muitas cópias dessas moléculas; no entanto, muitas vezes, não temos quantidade o bastante de material original. É só imaginarmos uma cena de crime, na qual temos apenas uma gota de sangue ou um bulbo de fio de cabelo. Então, como ter DNA em grande quantidade?

A solução existe, excluir a partir do conhecimento de sequências de nucleotídeos completas de genomas de diversas espécies, é possível isolar genes e outros fragmentos de DNA de interesse bem como amplificar a sequência até conseguir milhões de cópias e facilitar a análise.

Esse procedimento, denominado reação em cadeia da polimerase, usualmente abreviado como PCR, é realizado totalmente *in vitro*, em três etapas que procuram simular a replicação do DNA nas células vivas.

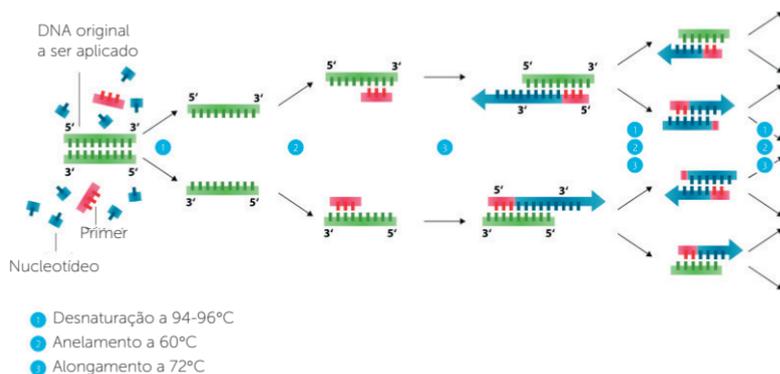
Na primeira etapa o DNA genômico, que contém a sequência de interesse a ser amplificada, é desnaturado por aquecimento a uma temperatura entre 92 e 95°C por 15 segundos, permitindo a quebra das pontes de hidrogênio e separação da fita dupla. Na segunda etapa, o DNA desnaturado é anelado ou hibridizado por incubação sob temperatura de 50 a 60°C durante o tempo de 30 segundos e na presença de excesso oligonucleotídeos sintéticos adicionados ao meio. Para isso, é necessário um par de iniciadores ou *primers* que contenham uma sequência específica de nucleotídeos para o gene que se deseja avaliar, sendo cada um deles complementar às duas fitas de DNA. Com esse molde identificado e hibridizado à molécula desnaturada de DNA, inicia-se a terceira etapa, na qual a DNA polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita e duplicando o DNA. Assim, uma dupla hélice produz duas duplas hélices após um ciclo de replicação. Essa etapa de polimerização é realizada a uma temperatura de 70 a 72°C por 1,5 min.

O ciclo é reiniciado de 20 a 30 vezes, até se obter a concentração de DNA desejada; e, como cada etapa acontece sob uma temperatura específica, é utilizado um termociclador que controla não só a temperatura, como também o tempo e a quantidade de ciclos.

Atualmente, o uso da enzima conhecida como Taq polimerase, uma DNA polimerase termoestável encontrada na bactéria *Thermus aquaticus*, permite que a enzima seja adicionada logo na primeira etapa e resista às temperaturas de desnaturação, tornando dispensável a reposição dela nas demais etapas.

A figura a seguir apresenta o esquema das três etapas envolvidas na amplificação do DNA por PCR, com a desnaturação da fita molde, hibridização dos *primers* iniciadores (em vermelho) e alongamento do fragmento de DNA por nucleotídeos disponíveis no meio, formando as novas fitas em azul.

Figura 1.5 | Esquema da análise de PCR



Fonte: adaptada de <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase\\_chain\\_reaction.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg)>. Acesso em: 13 set. 2017.

Nos anos 2000, foi desenvolvida a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR), que combina a metodologia da PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência, permitindo que as três etapas estudadas anteriormente sejam realizadas em uma única, agilizando a obtenção dos resultados e reduzindo o risco de erros e contaminação da amostra.

## Sequenciamento de DNA

Grandes avanços na área genômica foram conquistados a partir do ano de 1990 com a publicação de sequências completas de cromossomos e genomas.

Mas você já se perguntou por que conhecer a sequência completa de bilhões de bases nitrogenadas do DNA de um organismo?



Refleta

As sequências de nucleotídeos nos genomas formam milhares de genes distribuídos nos cromossomos, como já vimos. Poderia o conhecimento de variações nos genes ser estudado e associado às características de interesse? E a identificação de genes que produzem determinadas enzimas poderia ser isolada e aplicada às indústrias farmacêuticas e de alimentos? Pense em quantas coisas os cientistas podem fazer de posse do conhecimento de genomas completos de diferentes espécies.

A maior dificuldade no sequenciamento de genomas está no fato de serem obtidas separadamente pequenas sequências de DNA, inicialmente em torno de 400 a 500pb (pares de base, unidade de medida que corresponde a dois nucleotídeos opostos e complementares na cadeia de DNA) chamados *contigs*, uma vez que ainda não existem tecnologias capazes de ler genomas inteiros, mesmo que, atualmente, sejam conseguidos fragmentos de DNA maiores. O fato de a molécula de DNA ter que ser fragmentada para posteriormente ser sequenciada gera a necessidade de montagem dos genomas, conhecida como *assembly*, que utiliza técnicas avançadas de bioinformática.

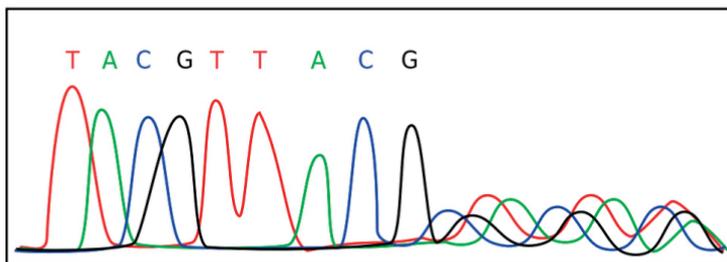
Com o objetivo inicial de sequenciamento de pequenos fragmentos de DNA, denominado *shotgun*, podem ser conseguidos rapidamente os *contigs* que, em etapas seguintes, deverão ser unidos para a montagem do genoma completo. O espaço existente entre um *contig* e outro pode ser obtido a partir da análise de hibridização de uma biblioteca genômica de DNA clonada de um vetor, técnica que veremos nas seções seguintes. Por meio dessa metodologia foram determinados os primeiros genomas da *H. influenzae*, bactéria causadora de doenças humanas, e da *Methanococcus jannaschii*, uma arqueia parte do microbioma humano.

Porém, a necessidade de montar genomas maiores (que pela técnica de *shotgun* levaria muito tempo) promoveu avanços na área.

Por isso, outras metodologias foram desenvolvidas e são mais aplicadas atualmente com a finalidade de facilitar o sequenciamento e o processo de montagem. Entre elas, destacam-se os métodos de Sanger, metodologia enzimática utilizada no Projeto do Genoma Humano; o pirosequenciamento ou método de síntese, fundamentado na detecção de raios luminosos emitidos de diferentes pirofosfatos e liberados a partir da síntese de DNA; SMRT (sequenciamento de DNA em tempo real), cujos nucleotídeos são marcados por fluorescência, e o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), que será abordado em outra unidade e é capaz de produzir 100 vezes mais dados que as técnicas convencionais citadas anteriormente.

A Figura 1.6 mostra um princípio básico do sequenciamento, que consiste na detecção das bases nitrogenadas adicionadas à fita molde de DNA pelo sinal que emitem, luminescência ou fluorescência, por exemplo, sendo registradas em picos que as diferem entre si.

Figura 1.6 | Detecção dos nucleotídeos ligados à fita de DNA molde durante análise de sequenciamento



Fonte: <<https://pixabay.com/pt/cromatograma-biologia-dna-154044/>>. Acesso em: 14 set. 2017.

Os computadores que trabalham junto dos sequenciadores contêm software específico para essa detecção, feita a cada nucleotídeo hibridizado à fita de DNA analisada.

Ambas as tecnologias podem necessitar da existência do genoma de referência para a montagem, assim como partir de uma montagem totalmente inédita, em casos nos quais não existe um sequenciamento prévio para o organismo em questão. Nesse caso, o sequenciamento é também chamado de sequenciamento *de novo*.



### Pesquise mais

Vídeos que apresentam a sequência das etapas de síntese das novas fitas de DNA com detecção dos nucleotídeos hibridizados à fita molde facilitam bastante a visualização e o entendimento das tecnologias de sequenciamento.

Sugerimos dois links que apresentam, respectivamente, o sequenciamento enzimático de Sanger e sequenciamento em tempo real:

Sequenciamento de Sanger. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=Uma54mKcR40>>. Acesso em: 16 out. 2017.

Sequenciamento de DNA. Disponível em: <<http://eaulas.usp.br/portal/video.action?idItem=1966>>. Acesso em: 16 out. 2017.

## Sem medo de errar

Agora que conhecemos as técnicas de análise do DNA, podemos ajudar o médico de Daiane a solucionar seu problema com a infecção bacteriana.

Uma vez que o medicamento prescrito e administrado de forma correta não apresentou efeito, o médico procurou conhecer o tipo de patógeno que infecta o organismo de Daiane; para isso, solicitou uma análise de PCR e está em dúvida entre uma infecção causada por *Salmonella sp.* e *Shigella*; assim, escolhe *primers* específicos para o gene *sdiA*, encontrado apenas no genoma da *Salmonella*, e lança mão de uma análise de DNA, que gera resultados bastante precisos, para que as chances de acerto no próximo tratamento sejam maiores.

A metodologia PCR promove a amplificação das regiões específicas do DNA da bactéria que podem ser utilizadas na sua identificação. Assim, esse gene foi escolhido com base em um conhecimento prévio, que pode partir dos sintomas que a paciente apresenta e do conhecimento do genoma de microrganismos; *primers* sintéticos seriam desenhados para o início da análise e, em um período de tempo relativamente curto, milhões de fragmentos de DNA ou genes seriam obtidos auxiliando na identificação do organismo, a partir da comparação das sequências de nucleotídeos com uma sequência referência. Para que a análise apresente resultados confiáveis, a extração e separação do DNA deve gerar moléculas puras, sem contaminação, seguindo protocolos e cuidados laboratoriais já testados, assim como kits comerciais indicados para o tipo de organismo e amostra em análise. Por fim, em caso de diagnóstico inconclusivo, fato que pode acontecer caso a bactéria tenha passado por processos de adaptação e seleção que alterem a sequência de nucleotídeos de alguns de seus genes, o sequenciamento genômico se mostra uma ferramenta poderosa, bastante precisa, capaz de fornecer informações de todo o genoma do organismo, inclusive regiões extragênicas, permitindo a identificação de variações de nucleotídeos e, ao mesmo tempo, a associação com a sequência referência de determinado organismo.

### Exame Papanicolau para identificação do vírus HPV

#### Descrição da situação-problema

Médicos ginecologistas indicam às suas pacientes a realização do exame Papanicolau pelo menos uma vez ao ano, que ocorre por meio da coleta de material do colo do útero e tem, entre outros objetivos, identificar a presença ou não do vírus HPV, causador do câncer de útero. O diagnóstico precoce é muito importante para que o tratamento seja bem-sucedido e controle os estágios mais graves da doença.

Então, o material amostrado é enviado ao laboratório de análise e fica o seguinte questionamento: qual a metodologia o laboratório pode utilizar na identificação da presença desse vírus?

#### Resolução da situação-problema

Como vimos em nosso material, as análises de DNA são ótimas aliadas no diagnóstico de doenças por serem bastante precisas quando conduzidas de forma correta. Portanto, a escolha do laboratório é por esse tipo de metodologia, mais especificamente a preparação da amostra por análise de PCR, que fornece bons resultados em um curto espaço de tempo, aproximadamente três dias, incluindo a emissão do laudo, e por um valor mais acessível que o sequenciamento genômico completo.

Nesse caso específico, o gene L1 é o alvo da análise de PCR para identificação do vírus HPV. Então, o DNA é extraído do material amostrado e separado do conteúdo celular com o uso de kits comerciais específicos. Um *primer* simples de 150pb é produzido sinteticamente para o gene L1, que será amplificado no termociclador seguindo a sequência de tempo e temperatura que vimos anteriormente. Partindo da maior concentração desse gene, o seu sequenciamento pode ser realizado; e, a partir da comparação da sequência de nucleotídeos com a sequência referência do gene do vírus HPV, ele pode ser identificado.

## Faça valer a pena

**1.** A metodologia de PCR, reação em cadeia da polimerase, é aplicada às análises em que as quantidades de amostras e/ou de DNA são baixas ou, até mesmo, quando se deseja preparar o DNA para futuras análises, como sequenciamento, pois permite a amplificação de fragmentos da molécula em até bilhões de vezes.

Escolha a alternativa que dispõe a sequência correta das seguintes etapas da PCR:

I – Anelamento.

II – Desnaturação.

III – Síntese.

a) I, II, III.

b) II, I, III.

c) III, II, I.

d) III, I, II.

e) II, III, I.

**2.** A metodologia de eletroforese em gel de agarose pode ser combinada à análise de PCR com o objetivo de identificar os fragmentos de DNA amplificados. Diversos fatores influenciam no deslocamento dos oligonucleotídeos pelo suporte de gel, influenciando diretamente no resultado da análise.

Assinale a alternativa que apresenta somente fatores que afetam o deslocamento dos oligonucleotídeos pelo gel de eletroforese.

a) Velocidade, concentração de água, concentração do gel.

b) Solução tampão, concentração de água, concentração do gel.

c) Corrente elétrica, concentração de água, concentração do gel.

d) Corrente elétrica, tamanho da molécula de DNA, concentração do gel.

e) Corrente elétrica, tamanho da molécula de DNA, campo magnético.

**3.** O sequenciamento de genomas completos caracteriza a grande revolução genômica e permite aos cientistas conhecer a sequência de bases nitrogenadas dos genes, das regiões intergênicas e, assim, as variações entre os indivíduos, tipos de proteínas que codificam, regiões genômicas mantidas, entre uma série de outras informações.

Sobre a tecnologia de sequenciamento genômico, desde os métodos iniciais até os mais modernos, assinale a alternativa correta:

a) Os métodos atuais dispensam a montagem do genoma, denominada *assembly*, por sequenciarem genomas inteiros.

- b) A montagem de genomas é feita manualmente em laboratório.
- c) A metodologia *Shotgun* sequencia rapidamente grandes fragmentos de DNA, acima de 10000pb.
- d) O método de pirosequenciamento tem como base reações enzimáticas.
- e) A montagem de genomas é feita a partir de sequências de referência ou mesmo quando nenhum organismo da espécie foi sequenciado anteriormente.

# Seção 1.3

## Tecnologia de DNA recombinante

### Diálogo aberto

Olá, aluno! Seja bem-vindo!

Para começarmos nossa nova seção de estudos, pense na seguinte situação:

Ao analisar o resultado do sequenciamento do DNA do patógeno que está causando a infecção de Daiane, foram observadas regiões alteradas quando comparadas à sequência de referência de determinada bactéria. Dr. Eduardo, então, supõe que esse microrganismo tenha sofrido mutações ou uma recombinação, tornando-se uma superbactéria e, portanto, mais resistente ao antibiótico.

A boa notícia é que uma nova proteína isolada de um fungo foi testada em pesquisas científicas e associada ao tratamento da infecção causada por essa superbactéria. Porém, esse efeito foi conseguido a partir de concentrações elevadas da proteína, difíceis de serem produzidas simplesmente pela extração direta dos próprios fungos. Diante disso, a empresa responsável pela pesquisa pensa em produzir a proteína em nível industrial e fornecê-la como um medicamento de outra forma. Mas, ficam as dúvidas: a produção da proteína seria por meio da produção de várias colônias de fungos? A empresa teria que passar a comprar essas colônias como matéria-prima? Isso seria viável? Que outra solução poderia ser aplicada?

### Não pode faltar

#### Análise estrutural e funcional de genomas

O conhecimento da sequência e dos tipos de nucleotídeos que compõem o genoma de um organismo obtido por meio da técnica de sequenciamento, como vimos na seção anterior, fornece-nos informações além dos genes e proteínas traduzidas.

A partir da publicação dos primeiros genomas completos, surgiu a necessidade de compará-los e analisá-los, com objetivo de extrair o

máximo de informações. Isso se tornou possível por meio de técnicas de bioinformática e do desenvolvimento de algoritmos que alinham global e localmente as sequências, agrupam genes e ainda permitem análise filogenética.

Atualmente, existem diversos bancos de dados e ferramentas computacionais de acesso público ou privado que combinam esses algoritmos em uma interface amigável, permitindo o acesso e a análise das informações genômicas por meio da internet.

As análises comparativas de estrutura e funcionalidade de genomas permitem:

a) Comparar a estrutura genômica: identificação de rearranjos no nível de DNA e de genes; análise de repetições; preservação da ordem linear de genes de diferentes espécies adquiridos de um ancestral comum (genes ortólogos) e análise de genes vizinhos ao gene em estudo.

b) Funcionalidade de genomas: identificação de regiões codificantes; comparação dos conteúdos gênicos e proteicos; análise de conservação de genes ortólogos e de família de genes parálogos (genes de mesma sequência obtidos por duplicação); eventos de fusão e/ou ligação funcional entre genes e identificação de vias metabólicas comuns aos genes.

c) Comparação das regiões não codificantes: envolve a identificação de elementos regulatórios.



### Pesquise mais

Existem inúmeros bancos de análises de genomas disponíveis na internet. Consulte alguns deles nos seguintes links e veja suas funcionalidades: *String db*. Disponível em: <<https://string-db.org/>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

*David Functional Annotation Tools*. Disponível em: <<https://david.ncifcrf.gov/>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

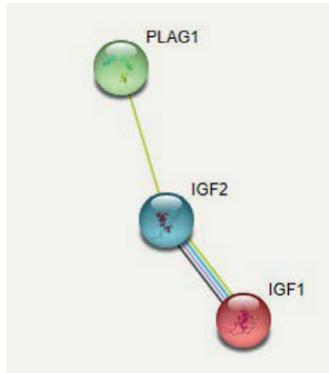
*Panther db*. Disponível em: <<http://pantherdb.org/>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

*Gene Ontology Consortium*. Disponível em: <<http://www.geneontology.org/>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

Você pode também analisar os seguintes genes separadamente e em conjunto para ver os resultados: PLAG1, IGF1, IGF2. Pratique!

A Figura 1.7 apresenta a rede formada entre os genes PLAG1, IGF1 e IGF2 por meio do banco de dados *String db*.

Figura 1.7 | Análise de enriquecimento funcional entre os genes PLAG1, IGF1 e IGF2 no *String db*



Fonte: <<https://string-db.org/>>. Acesso em: 19 set. 2017.

Esse banco de dados, por exemplo, é desenvolvido com algoritmo que pesquisa, em vários bancos de dados de genes e depósitos de resultados científicos, as funções, a estrutura e a homologia dos genes. Isso permite a formação de redes como essa, que agrupam genes em vias metabólicas em comum, associam a ação de um à ação do outro por meio de linhas de diferentes cores ou simplesmente os mantêm sem ligação, caso os genes não apresentem características em comum.

A rede formada na Figura 1.7 é parte de via metabólica de crescimento em humanos e outras espécies.

### **Tecnologia do DNA recombinante e conceito de bibliotecas genômicas**

Para que você entenda a tecnologia do DNA recombinante, gostaríamos de lembrá-lo da nossa seção anterior, em que vimos as enzimas de restrição, ou endonucleases, capazes de cortar a molécula de DNA em diferentes fragmentos. Ainda pedimos sua atenção quanto ao fato desses fragmentos apresentarem a capacidade de se ligarem novamente a outros fragmentos de DNA, que podem ser do próprio organismo, da mesma espécie ou de espécies e organismos diferentes, inicialmente, por pontes de hidrogênio e, posteriormente, pela ação da DNA ligase, pelo estabelecimento das ligações fosfodiéster.

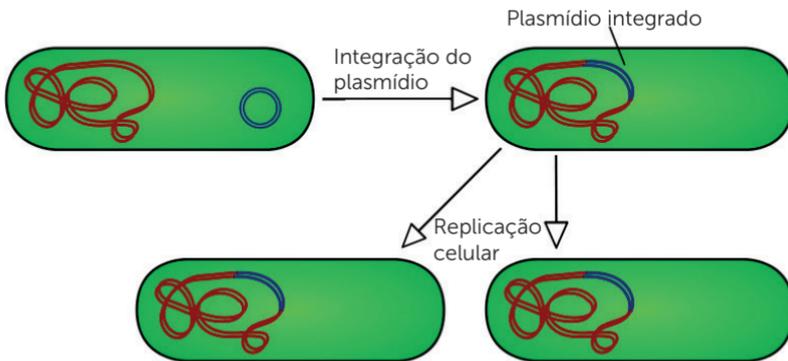
Esse é exatamente o princípio da técnica de recombinação de DNA.

Genes de interesse são identificados, cortados por enzimas de restrição específicas, e inseridos em outros fragmentos de DNA cortados pela mesma enzima, chamados plasmídeos. Os novos fragmentos obtidos já são moléculas de DNA recombinante, pois combinam, na mesma estrutura, DNAs provenientes de diferentes origens, que serão inseridos em outro organismo, geralmente bactérias e leveduras. Essa inserção tem como objetivo conseguir uma população por meio do processo de clonagem, em que uma célula, que agora contém o gene de interesse, irá se multiplicar, dando origem a uma população de clones que mantêm esse gene.

Ao final do processo, espera-se que todas as células contenham uma cópia do plasmídeo portador do gene de interesse e que ele possa se expressar produzindo a proteína desejada.

Veja na figura a seguir o esquema que exemplifica a técnica de DNA recombinante.

Figura 1.8 | Esquema da tecnologia de DNA recombinante



Fonte: adaptada de <<https://goo.gl/ooH2Wx>>. Acesso em: 19 set. 2017.

Perceba que o DNA da bactéria está representado em vermelho e o plasmídeo em azul. Pela ação das enzimas apropriadas, citadas anteriormente, o DNA é cortado e o novo fragmento inserido, sendo, em seguida, multiplicado nas novas células.



A tecnologia do DNA recombinante é aplicada à produção de substâncias de interesse médico e farmacêutico, como insulina humana, hormônio de crescimento e vacinas; na produção de enzimas industriais; investigação de paternidade; diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas; terapia gênica; transgênicos.

Técnica semelhante à descrita é utilizada para a construção de bibliotecas genômicas, que são preparadas por meio do isolamento de todo o DNA de um organismo, que é fragmentado por endonucleases de restrição e inserido em um vetor ou segundo organismo de clonagem. Os fragmentos do DNA genômico se ligam ao DNA do vetor, formando moléculas recombinantes que são inseridas em célula hospedeira para amplificação por replicação *in vivo*.

Em alguns casos pode ser necessário o uso de substâncias químicas que tornem as células bacterianas permeáveis ao DNA plasmídico.

O processo é concluído com a seleção das células transformadas por meio de cultura e condições em que o gene de interesse do vetor seja essencial para o crescimento do hospedeiro.

Uma biblioteca genômica de qualidade contém praticamente todas as sequências de DNA do genoma de interesse, e espera-se que seja representativa de todos os genes do organismo, sendo muito útil quando se pretende isolar um gene específico.

### **Clonagem em vetores de expressão para produção de proteínas recombinantes**

Estudando as técnicas de DNA recombinante, usamos diversas vezes a palavra vetor. Mas, afinal, o que é esse vetor?

Como vimos, as técnicas de DNA recombinante vão além da construção da molécula recombinante e envolve também a amplificação delas com a produção de cópias idênticas, também chamadas de clones. Aí entram os vetores, que são moléculas de DNA parentais de um organismo com capacidade de replicação, o DNA recombinante é inserido nele, e juntos são capazes de autorreplicação, aumentando em quantidade e, assim, podendo ser aplicados em diversos usos, com produção de maior quantidade da proteína de interesse.

A maioria dos vetores de clonagem utilizados é derivada de cromossomos de plasmídeos, moléculas de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico, ou bacteriófagos, vírus capazes de infectar bactérias e de integrarem seu material genético ao DNA delas, características que garantem a desejada amplificação dos segmentos recombinantes.

Para que se tenha um bom vetor de clonagem, ele deve apresentar três estruturas essenciais: a) uma origem de replicação; b) um gene marcador dominante, geralmente que confere resistência a fármacos e à célula hospedeira, que acompanhará o DNA recombinante durante a replicação; e c) pelo menos um sítio de quebra único para endonuclease de restrição fora da origem de replicação e do gene marcador, que permitirá a manipulação do material amplificado.

A desvantagem desses vetores é que aceitam a adição de pedaços pequenos de DNA, entre 10 a 15 mil bases (ou kilobases – kb). Por isso, hoje são usados vetores de clonagem com cromossomos artificiais, como os de leveduras (YAC), bacterianos (BAC) e de fago P1 (PAC), que contêm apenas as partes essenciais dos cromossomos, mas abrangem as estruturas essenciais mencionadas anteriormente e aceitam adição de fragmentos de DNA maiores.

Esses vetores mais modernos também contêm grupo de sítios de restrição específicos denominados sítios de clonagem múltipla (MCS) ou *polylinker*, permitindo a inserção de mais de um fragmento de DNA recombinante no vetor.



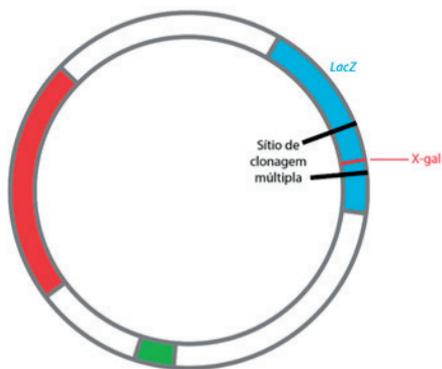
### Exemplificando

O *Bluescript* é um vetor fago que contém um sítio de clonagem múltipla (MCS) e que apresenta vários sítios de clivagem por endonucleases, duas origens de replicação e um bom marcador selecionável, um gene que confere resistência à ampicilina. O MCS está localizado na região do gene *LacZ*, que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase, participante do catabolismo da lactose. Quando o DNA recombinante é inserido, interfere na ação do *LacZ*, que perde a capacidade de quebrar um composto conhecido como X-gal em uma reação que produziria cor azul. Assim, a ausência de cor, uma vez que o X-gal é incolor, indica células sem a atividade da  $\beta$ -galactosidase e, como consequência, indica a presença de um DNA recombinante.

A Figura 1.9 mostra a estrutura do DNA do vetor *Bluescript*: em verde a origem de replicação; em vermelho, o gene de resistência à ampicilina; em azul o Sítio de Clonagem Múltipla (MCS), localizado na região do gene *LacZ*.

Na Figura 1.10 pode ser visto o resultado da inserção do DNA recombinante: positivo nas colônias brancas/incolores, indicando a inatividade da  $\beta$ -galactosidase, e negativo nas colônias azuis, que continuam degradando o X-gal em produtos azuis. Ou seja, se o DNA entrou no vetor, ele “quebra” a sequência da *LacZ* que não deixa as colônias azuis.

Figura 1.9 | Estrutura do DNA do vetor *Bluescript*



Fonte: adaptada de <<https://goo.gl/wPnaKo>>. Acesso em: 22 out. 2017.

Figura 1.10 | Teste branco/azul para o vetor recombinante *Bluescript*



Fonte: <[http://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Blue-white\\_test.jpg](http://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Blue-white_test.jpg)>. Acesso em: 22 out. 2017.

Outra vantagem desses vetores é que, além de permitirem a adição de fragmentos de DNA maiores (300 a 600kb), podem replicar-se na bactéria *E. coli* como vetores plasmidiais, de forma totalmente independente do DNA da bactéria.

Com a maior quantidade de DNA cromossômico que contém o gene de interesse adicionado à molécula recombinante, haverá também maior quantidade da proteína codificada por ele, obtida pelos processos de transcrição e tradução, extraída do extrato celular e aplicada de diferentes formas.

## **Transgenia e organismos geneticamente modificados**

Com base na técnica de DNA recombinante, foi possível não apenas produzir laboratorialmente proteínas de interesse, mas também inserir novos fragmentos de DNA em cromossomos de organismos mais complexos (como eucariotos multicelulares) e conseguir, nesses organismos, a expressão de características de interesse.

Esse processo dá nome aos organismos transgênicos, que conceitualmente tiveram parte do material genético modificado pela introdução de DNA de outro organismo (exógeno). Muito frequentemente, os transgênicos são confundidos com os organismos geneticamente modificados, porém esses últimos não são adicionados de fragmentos de DNA externo, mas passam por manipulação e alteração na estrutura ou função do próprio material genético por meio de técnicas de engenharia genética.

Por exemplo, o DNA de uma bactéria pode ser modificado para expressar um gene mais vezes ou a troca de uma base nitrogenada (mutação) pode ser promovida para conseguir característica de interesse. Esses organismos são geneticamente modificados mas não são transgênicos, pois não receberam gene de outra espécie.

Para obter transgênicos, temos duas metodologias principais que são aplicadas aos animais. Uma requer a injeção de DNA nos embriões e a outra em células-tronco embrionárias em cultura.

Para a injeção de DNA nos embriões, os ovócitos são removidos cirurgicamente das mães e fertilizados in vitro. O DNA é microinjetado com o uso de uma agulha de vidro de ponta muito fina em pronúcleo proveniente do pai. Em geral, injetam-se muitas cópias do gene de interesse e, com frequência, ocorrem muitas integrações em sítios aleatórios do genoma.

A partir de cruzamentos dessa geração parental de transgênicos, espera-se que todos os filhos apresentem o transgene.

A segunda técnica consiste na aplicação da injeção de DNA em células-tronco retiradas dos embriões nos estágios iniciais do desenvolvimento e que são reinseridas em um blastocisto para desenvolver-se. Assim como na tecnologia anterior, para que o gene seja mantido na espécie, é necessário o cruzamento dos animais transgênicos da primeira geração, indicando que os transgenes apresentam padrão normal de herança, pois foram integrados ao genoma do hospedeiro.

Porcos, peixes, galinhas e camundongos já foram produzidos como organismos transgênicos.

Os vegetais transgênicos podem ser produzidos por meio de vários procedimentos diferentes. Um deles, usado em larga escala, é conhecido como bombardeamento de microprojéteis. É feito o disparo de partículas de tungstênio (ou outro material) revestidas de DNA para dentro da célula vegetal. Outra tecnologia usa o pulso de eletricidade para introduzir o DNA nas células, conhecida como eletroporação. Mas o método mais utilizado na produção de vegetais transgênicos é a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Essa é uma bactéria de solo que desenvolveu um mecanismo de engenharia genética natural e consegue transferir um segmento de seu DNA para as células vegetais.

*A. tumefaciens* possui um grande plasmídeo chamado de Ti, formado por uma região denominada T-DNA e outra região *vir*, de virulência. A região do T-DNA possui 23000 pares de base (pb) e 13 genes conhecidos, sendo a que apresenta capacidade de se ligar ao DNA cromossômico do vegetal, processo controlado pelos genes da região de virulência.

Dessa forma, os genes de interesse são inseridos por técnicas de DNA recombinante na região T-DNA do plasmídeo Ti, e este faz a junção do plasmídeo ao DNA das células vegetais.

A técnica aplicada às células germinativas dos vegetais apresenta a vantagem de que uma única célula é capaz de produzir todas as células diferenciadas do vegetal maduro, garantindo a produção do organismo transgênico logo na primeira geração.

Milho, soja, algodão e canola são exemplos de vegetais transgênicos amplamente utilizados em todo mundo.



## Assimile

Todo transgênico é um Organismo Geneticamente Modificado (OGM), porém nem todo OGM é um transgênico.

Como já falamos, os OGM são assim classificados por terem passado por manipulação do material genético com o objetivo de alterar sua estrutura, função ou modo de expressão.

Outro exemplo da tecnologia de OGM é a metilação do DNA, que significa adicionar um grupo metil na citosina, que geralmente precede uma guanina e está presente principalmente em regiões promotoras dos genes. Essa alteração é herdável e participa da transcrição gênica.

### Aplicações biotecnológicas de organismos transgênicos

Os organismos transgênicos são desenvolvidos com o objetivo de conseguir a expressão de característica de interesse na planta ou animal, ou produção em larga escala de uma proteína.

Veja no quadro a seguir alguns dos transgênicos já desenvolvidos e quais características diferenciam-nos.

Quadro 1.2 | Organismos transgênicos

Organismo transgênico	Origem dos genes	Características adquiridas
Algodão	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistência à broca do milho europeia e ao herbicida
Soja	<i>Agrobacterium</i>	Resistência ao herbicida glifosato
Milho	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistência a insetos
<i>Aedes Aegypti</i>	Sintéticos	Prole estéril e que não chega à vida adulta
Salmão	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> ou peixe Chinook, e da enguia <i>Zoarces americanus</i>	Crescimento mais rápido dos animais

<i>E. coli</i>	Humano	Produção de insulina e hormônio de crescimento
Tabaco	<i>Vibrio cholerae</i>	Produção de vacina contra cólera



### Refleta

A partir dos exemplos citados na tabela, que nos dão uma noção das várias aplicações dos transgênicos nas mais diversas áreas, que tipo de organismo transgênico você desenvolveria? Com qual objetivo?

### Controle de qualidade na indústria de biotecnologia

Com tudo que aprendemos até agora, todas essas técnicas laboratoriais que levam a biotecnologia às diversas áreas do conhecimento e permitem grandes avanços no campo da pesquisa e tecnologia, devemos pensar também que os cuidados nessas indústrias e nesses laboratórios devem ser máximos para que quaisquer erros – que não são incomuns, já que se trabalha com moléculas pequenas, algumas delas até instáveis, como o RNA, e sujeitas à contaminação sejam evitados.

Por isso, o controle de qualidade faz parte do dia a dia dessas áreas de produção como rotina para garantir produtos, serviços e resultados de excelência.



### Assimile

É possível obter resultados ruins a partir de metodologias testadas e consagradas quando não são bem executadas, mas é impossível conseguir resultados bons sem adotar o máximo de cuidado, precisão e controle de qualidade às técnicas utilizadas.

Alguns cuidados básicos devem ser praticados para se obter bons resultados, entre eles: a) nunca colocar livros e objetos pessoais sobre as bancadas de trabalho, reservando um local apropriado para o armazenamento desses objetos; b) sempre usar avental limpo, fechado, e jamais sair das dependências do laboratório ou indústria usando-o; c) manter portas e janelas fechadas durante o trabalho para

evitar contaminações originadas das correntes de ar; d) não comer, fumar, beber, conversar e pipetar com a boca, nosso organismo é naturalmente contaminado; e) prender os cabelos, de preferência com o uso de toucas descartáveis; f) descartar, de forma apropriada, materiais já utilizados, contaminados, para evitar contaminação cruzada; g) a contaminação cruzada também pode ser evitada quando se estabelece um fluxo de trabalho cujas etapas iniciais não cruzem com etapas finais; h) a manipulação de microrganismos deve ser rápida e eficiente, seguindo detalhadamente os protocolos já testados.

O cuidado no preparo dos meios de cultura também influencia na qualidade dos processos. Dependendo do objetivo (transportar, manter ou promover o crescimento do microrganismo), os tipos e as quantidades de nutrientes presentes no meio podem variar. Assim, o objetivo deve ser muito bem conhecido e analisado para cada caso e tipo de microrganismo.

A esterilização eficiente dos meios de cultura garante a sua inocuidade, ou seja, a ausência de outros seres vivos que podem contaminá-lo, assim como a assepsia do local de trabalho e instrumentos utilizados.

As técnicas de assepsia envolvem os procedimentos responsáveis pela esterilização de instrumentos e locais a serem utilizados, como quando submetemos a alça e fio de inoculação à queima pelo calor da chama do bico de Bunsen.

Os materiais esterilizados devem ser armazenados fechados ou em embalagens também estéreis para evitar a contaminação.

Para conferir se todas as etapas de uma manipulação biotecnológica foram realizadas de acordo com as normas do controle de qualidade, normalmente os laboratórios e indústrias aplicam checklists de conferência, nos quais cada parâmetro de controle do processo é marcado como conforme (C), quando está de acordo com as normas do controle de qualidade, ou não conforme (NC), quando apresenta alguma irregularidade. No caso de NCs, o motivo da falha deve ser apontado, assim como os procedimentos que foram adotados para corrigi-lo.



## Faça você mesmo

Com base em seus conhecimentos de laboratório, crie um checklist de parâmetros, cujos controle e avaliação você julga ser importantes por influenciarem na qualidade das análises.

Veja o exemplo de um checklist para verificação de laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Disponível em: <<https://www.ufjf.br/icb/files/2010/10/Check-List-para-Laboratório.xls>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

## Sem medo de errar

Vamos voltar a pensar no problema da empresa que deseja produzir em escala industrial uma proteína, identificada em um fungo, que atua no tratamento de uma infecção provocada por uma superbactéria.

Com certeza extrair essa proteína de milhares de fungos não é a melhor opção, não sendo viável econômica nem tecnicamente. Mas, agora que conhecemos a tecnologia do DNA recombinante, a solução é prática e eficiente: criar uma levedura transgênica.

Identificado o gene que codifica essa proteína, ele será separado do DNA do fungo por endonucleases de restrição e ligado novamente a um plasmídeo. Esse plasmídeo, então, agora presente em uma célula (selecionada de uma levedura, por exemplo) sofrerá divisão, transmitindo a nova molécula de DNA recombinante às novas células formadas. Agora, com o gene produtor da proteína presente no genoma da levedura, ela passará a produzir a proteína também e será submetida a todas as condições ambientais necessárias para essa produção.

Assim, em um curto espaço de tempo, serão obtidas de milhares a milhões de células expressando o gene codificador da proteína de interesse, podendo ser isolada, concentrada e comercializada.

## Avançando na prática

### Resultado do sequenciamento do patógeno que infecta Daiane

#### Descrição da situação-problema

Ao analisar o resultado do sequenciamento do DNA do patógeno, foram observadas regiões alteradas quando comparadas à sequência de referência daquela bactéria que a infectou. Dr.

Eduardo, então, supõe que esse microrganismo tenha sofrido mutações ou recombinação, tornando-se uma superbactéria, e por isso tenha aumentado sua resistência ao antibiótico. Atualmente, esse mecanismo de sobrevivência e seleção natural desenvolvido, inicialmente pelos seres unicelulares, já é técnica dominada pelo homem e empregada para o melhoramento de características de interesse em produtos agropecuários e para a produção de medicamentos na indústria farmacêutica. Mas, agora que você já estudou algumas técnicas de manipulação do DNA, consegue associar esse mecanismo a elas? E, mais, conhecendo essa maquinaria biológica, como o homem faz uso da tecnologia para obter produtos de interesse?

### **Resolução da situação-problema**

As células microbianas, quando submetidas a condições adversas, podem sofrer mutações, trocas de bases nitrogenadas em determinado local e originar, então, uma proteína diferente da original – o que pode proporcionar a elas maior resistência e características diferenciadas. Hoje, organismos geneticamente modificados sofrem ação na estrutura do DNA ou na sua sequência de bases por engenharia genética para a produção de características de interesse.

A recombinação de fragmentos do DNA durante a divisão celular também é feita de forma semelhante em laboratório por meio da técnica de DNA recombinante, pela qual fragmentos de DNA de diferentes origens se ligam formando uma nova molécula com capacidade de replicação, inserindo em uma espécie um novo gene que ela não continha. Dessa forma, pesquisadores conseguiram desenvolver produtos transgênicos, como a soja, resistente ao herbicida RoundUP; o mosquito da dengue que não chega à idade de reprodução e um tabaco que possui um transgene produtor de proteína da vacina de cólera.

### **Faça valer a pena**

**1.** Um sequenciamento genômico gera muito mais informações do que podemos imaginar. Existem diversas ferramentas gratuitas disponíveis para avaliação das informações obtidas a partir da sequência de bases nitrogenadas e genes presentes nos genomas dos organismos vivos.

A partir da avaliação funcional e estrutural de um genoma, que tipo de informações podem ser geradas?

- a) Identificação de clones.
- b) Identificação de regiões codificadoras de proteínas.
- c) Identificação de proteínas desnaturadas.
- d) Quantificação de proteínas traduzidas.
- e) Formação de redes entre genes de diferentes espécies.

**2.** A tecnologia do DNA recombinante permite a ligação de diferentes fragmentos de DNA, formando uma nova molécula que mantém a capacidade de replicação e, por isso, transmite o novo DNA para novas células formadas.

Sobre a construção de uma molécula de DNA recombinante, assinale a alternativa correta.

- a) O DNA recombinante é formado pela união de fragmentos de DNA de uma mesma espécie.
- b) As enzimas endonucleases de restrição são responsáveis pela ligação dos fragmentos de DNA formados.
- c) O fragmento de DNA de interesse é ligado a outro fragmento chamado plasmídeo, que tem capacidade de inserir-se à molécula de DNA de uma nova célula.
- d) O objetivo da tecnologia do DNA recombinante é inserir em uma nova célula uma região reguladora de genes.
- e) A inserção de um novo fragmento de DNA não altera a estrutura e a função da molécula.

**3.** Os organismos transgênicos (produzidos a partir da inserção de um transgene ao genoma de um organismo) são alvos de muitas críticas e desconfiças, porém também trazem muitos benefícios às áreas em que são utilizados.

Sobre transgênicos, tecnologias aplicadas, objetivos e tipos de organismos desenvolvidos, marque a opção correta.

- a) Um organismo transgênico não está sujeito à mutação durante o processo de replicação de suas células, mantendo o transgene na espécie.
- b) Transgênicos são desenvolvidos a partir de diversos objetivos, entre eles, aumentar a resistência de bactérias a antibióticos.
- c) Transgênicos são estéreis, assim, a cada novo indivíduo, o transgene deve ser inserido novamente.

d) O transgene é inserido em uma nova espécie para que ela passe a apresentar a ação desse gene, seja como característica expressa ou como controle de regiões codificantes.

e) Em animais, espera-se que a primeira geração de transgênicos apresente o transgene em todas as suas células.

# Referências

- BLOONERD. Western Blot imuno blot. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=46NnUeewmbM>>. Acesso em: 8 out. 2017.
- BROWN, T. A. **Genética, um enfoque molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 1999. p. 297-301.
- CRESTANI, G. A. Sequenciamento de Sanger. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=Uma54mKcR40>>. Acesso em: 16 out. 2017.
- CATANHO, M.; DE MIRANDA, A.B. Comparando genomas: bancos de dados e ferramentas computacionais para a análise comparativa de genomas eucariotos. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**. Suplemento – Bioinformática e Saúde, v. 1, n. 2, p. 355-358, 2007.
- GASSEN, H.A.; BONACELLI, M.B.M.; SALLES-FILHO, S.L.M.; ODA, L.M.; SOARES, B.E.C.; MELLENTIN, O.; CHAMAS, C.I.; WINNACKER, E.L. **Biotecnologia em Discussão**. N.º8. Cadernos Adenauer, 2000, p. 9-49.
- GOUVEIA, J. J. S.; REGITANO, L. C. A. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicados à Produção Animal**. São Carlos: Embrapa, 2007. p. 22-30.
- KASVI. Eletroforese horizontal de DNA em gel de agarose. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=vL3EfRx78PO>>. Acesso em: 11 out. 2017.
- MESELSON, M.; STAHL, F.W. The replication of DNA. **Cold Spring Harb Symp Quant. Biol.**, v. 23, 1958, p. 9-12.
- MORROW, J.F.; COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y., BOYER, H.W., GOODMAN, H.M., HELLING, R.B. Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. **PNAS**, v.71, n.5, 1974, p.1743-1747.
- PAPO Nerd, DNA do morango. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=7RrKrL3Lmgc>>. Acesso em: 20 out. 2017.
- PONTO Biologia. Extraindo DNA do morango: o que aprendemos? Disponível em: <<http://pontobiologia.com.br/extraindo-dna-do-morango/>>. Acesso em: 20 out. 2017.
- RAVE, C.F. Sequenciamento de DNA. Disponível em: <<http://eaulas.usp.br/portal/video.action?idItem=1966>>. Acesso em: 16 out. 2017.
- SILVA, I. Northern Blot. Know. Disponível em: <<http://know.net/ciencterravida/biologia/northern-blot/>>. Acesso em: 8 out. 2017.
- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2013. p. 375-382.
- SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Res.**, 2017.
- The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Res.**, 2017.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, KP.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L.J.; VON MERING, C.

STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Res.** 2015.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. A structure of deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v.171, 1953, p.737-738.

# Tecnologia e biotecnologia de alimentos

## Convite ao estudo

Olá, aluno!

Bem-vindo à nossa nova seção.

Após aprendermos o fascinante mecanismo de ação e funcionamento do material genético e como ele poder ser manipulado para a produção de características de interesse, o que acha de aplicar esse conhecimento em questões práticas que podem promover resultados positivos à sociedade?

O Brasil é um país que se destaca internacionalmente pela produção de alimentos. Só para que tenha uma pequena ideia, somos o maior produtor de soja e café do mundo, segundo maior produtor de carne bovina e ocupamos a terceira posição na produção de milho; porém, também somos campeões em desperdício. Em 2016, estima-se que 30% da produção agrícola tenha sido perdida por não se apresentar apta ao consumo e processamento. Além desse fato, também somos produtores de *commodities* e dependentes dos preços determinados pelo mercado mundial, totalmente relacionado à oferta e demanda de produtos. Com isso, técnicas de conservação e processamento podem ser caracterizadas como ferramentas aplicadas ao melhoramento da produtividade, qualidade e diversidade de alimentos que colocamos no mercado.

E aproveitando o que já aprendemos, o uso de organismos geneticamente modificados pode melhorar ainda mais as características produtivas desse cenário, apesar de ainda ser alvo de opiniões distintas com relação à eficácia e segurança.

Ao longo desta unidade de ensino, trabalharemos situações que nos remetem ao setor agroindustrial, suas tecnologias, linhas de produção, controles de qualidade e os inúmeros produtos obtidos.

# Seção 2.1

## Introdução à tecnologia de alimentos

### Diálogo aberto

Vamos analisar juntos a seguinte situação: Francisco é um agricultor de subsistência do sul do Brasil. Em suas terras, ele planta diversas culturas vegetais que são suficientes para manter sua família de 5 filhos, 8 netos e esposa. Porém, excepcionalmente no mês de fevereiro de 2017, a produção de uma linhagem transgênica de pepino foi consideravelmente superior aos meses anteriores, e mesmo após ter vendido grande quantidade da produção na feira local, ainda restou a Francisco muitas unidades do fruto. Preocupado com a perecibilidade do alimento e não querendo somar às estatísticas de perdas de produtos de origem vegetal do nosso país, passou a pensar nas possibilidades de como conservar os pepinos para que se apresentassem aptos ao consumo de sua família por maior período de tempo. Conhecendo esse pequeno agricultor e suas necessidades, como você o orientaria? Quais técnicas podem ser aplicadas a essa matéria-prima? Como adequar a embalagem aos produtos obtidos?

### Não pode faltar

#### Histórico, definições e importância da tecnologia de alimentos

Para a Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, a tecnologia de alimentos é definida como “a aplicação de métodos e da técnica, para o preparo, armazenamento, processamento, controle, embalagem, distribuição e utilização dos alimentos” (EVANGELISTA, 2008).

De forma mais simples, todas as técnicas físicas, químicas e biológicas que são capazes de transformar uma matéria-prima, tornando-a ou mantendo-a apta ao consumo humano, assim como as técnicas de qualidade, embalagem, armazenagem e logística que envolvem esses produtos, são englobadas pela tecnologia de alimentos.

Os primeiros relatos da intervenção do homem sobre alimentos datam da Pré-História da humanidade, com a aplicação de técnicas

para a conservação deles, uma vez que era necessário que os alimentos mantivessem suas características e estivessem aptos ao consumo por um período de tempo maior. Há 4.000 anos a.C. o fogo já era usado para cozimento dos alimentos, aumentando sua vida útil pela destruição de parte da flora microbiana.

Posteriormente, foram descobertos os efeitos benéficos do uso do frio (gelo/neve), da secagem ao sol, fermentação natural, defumação, salga, cura, conservas em vinagre e sal na conservação e produção de alimentos diferenciados, que desenvolviam sabores e odores específicos.



### Pesquise mais

Consulte a linha do tempo da evolução da tecnologia de alimentos (com foco na conservação) apresentada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL. Fonte: <<http://www.alimentosprocessados.com.br/ciencia-tecnologia-origem-e-evolucao-da-tecnologia-de-alimentos.php>>. Acesso em: 18 out. 2017.

Hoje, conhecemos muito mais que antes: os fatores de perecibilidade, as ricas fontes de nutrientes, os microrganismos contaminantes naturalmente presentes no solo, animais, água, manipuladores, ar, pó, equipamentos e utensílios. Com o crescente aumento da população mundial, mais do que nunca a tecnologia de alimentos é uma importante aliada na garantia do fornecimento de alimentos em grande quantidade, respaldado na melhoria da dieta e no estado nutricional das pessoas, e com prazo de validade satisfatório, o que, conseqüentemente, reduz as perdas.

Estima-se que a perda de alimentos no campo, na América Latina, chegue a 40% (EVANGELISTA, 2008). Muito, não acha? Quantas pessoas seriam alimentadas com essa quantidade perdida?

E poderia acontecer com o senhor Francisco, pequeno agricultor mencionado no início do nosso estudo, caso não existissem as técnicas de manipulação e processamento de alimentos.

Também, o desenvolvimento dos alimentos prontos e semi-prontos é importante nas sociedades em que a mulher cada vez mais participa do mercado de trabalho e tem menos tempo para cozinhar. A indústria é capaz de fornecer alimentos com qualidade higiênico-

sanitária satisfatória que não é conseguida em alimentos *in natura*, pela falta de controle de sua qualidade microbiológica.



**Refleta**

Ao mesmo tempo, somado a todos os fatores de importância da tecnologia de alimentos já apresentados, você imagina a variedade de produtos que podemos fazer a partir de uma mesma matéria-prima pelo emprego de diferentes técnicas? Ou seja, já imaginou a quantidade de sabores, odores, formas e cores que eles podem apresentar? Faça estes exercícios com o leite: Quantos produtos diferentes são obtidos a partir da matéria-prima leite? Quantos outros ainda podem ser inventados?

Com os avanços da ciência, as técnicas foram incorporando princípios científicos e, hoje, a Ciência e a Tecnologia de Alimentos têm suas bases em 4 áreas fundamentais: Nutrição, Química, Biologia e Engenharia.

### **Setores da produção de alimentos industrializados**

De acordo com Gava (2009), as indústrias de alimentos são classificadas nos seguintes tipos:

1. "Bebidas não alcoólicas: água, refrigerantes, sucos de frutas, refrescos e néctares; leites e misturas lácteas; chá, café, mate, chocolate e guaraná;
2. Bebidas alcoólicas: fermentadas (cerveja e vinho) e fermento-destiladas (aguardente, cachaça, uísque e gim);
3. Amidonaria – farinhas, panificação e massas alimentícias: farinhas, misturas preparadas e cereais para desjejum, pão, bolos, tortas e biscoitos, talharim, espaguete e outras massas alimentícias;
4. Leite fermentado, manteiga, queijos e outros produtos lácteos;
5. Produtos de confeitaria: balas, bombons e chocolates;
6. Óleos comestíveis e margarina;
7. Ovos e produtos derivados;
8. Vegetais fermentados: azeitonas, picles e chucrute;
9. Peixes e outros produtos aquáticos;

10. Frutas: em conserva, congeladas, desidratadas;
11. Geleias, doces em massa e produtos similares;
12. Nozes;
13. Carnes: bovina, porco, carneiro, galinha e peru;
14. Molhos para saladas;
15. Açúcar e xaropes: sacarose, glicose, frutose e dextrinas, mel, xaropes;
16. Hortaliças: em conserva, congeladas, desidratadas;
17. Ingredientes especiais: condimentos, pectina e gelatina, amido e gomas, ativadores de sabor;
18. Alimentos para crianças;
19. Sopas: concentradas, desidratadas;
20. Sal."

### **Métodos e técnicas gerais para o beneficiamento de produtos**

De início, os alimentos são manipulados a partir de uma ou mais matéria-prima; submetidas às transformações físicas, químicas ou biológicas, responsáveis por alterar e conferir determinadas características específicas de cada tipo de produto; embalados e destinados à comercialização.

O beneficiamento das matérias-primas é muito importante para que sejam produzidos alimentos seguros e de qualidade. É impossível conseguir um produto alimentício bom a partir de uma matéria-prima ruim.

Por isso, essas matérias, que muitas vezes entram nas formulações dos produtos como ingredientes principais, passam por tratamentos preliminares de limpeza, no próprio campo, para a retirada de contaminantes físicos, como poeira, folhas, pedaços de pau e insetos. Podem ser selecionadas e classificadas de acordo com alguma característica que as definam, como tamanho e grau de maturação, serem submetidas à fumigação (controle de pragas, desinfecção por via seca), e então são transportadas para a indústria ou setor de transformação.

O Sr. Francisco, citado no início desta seção, faz fumigação da sua plantação de pepino e, na colheita manual, já retira folhas e talos.

Já na indústria, grandes colheitadeiras, como a colheitadeira de cana-de-açúcar mostrada na figura e a seguir, ao mesmo tempo que remove as plantas do solo, interiormente já faz a limpeza dessa matéria-prima separando os pedaços de folhas e raízes, que são eliminados em uma parte da máquina, enquanto os colmos ou gomos do caule açucarados de interesse são transportados por outra parte e descarregados em um trator auxiliar.

Figura 2.1 | Colheitadeira de cana-de-açúcar



Fonte: <<https://goo.gl/XG5sog>>. Acesso em: 11 out. 2017.

Na indústria passam por outro processo de limpeza, no qual pode ser incluído uma limpeza magnética para a remoção de possíveis pregos, parafusos, entre outras partes dos equipamentos de colheita, manipulação e transporte que, acidentalmente, podem ser encontrados junto da matéria-prima.

A limpeza industrial também engloba lavagem a seco e com água, aspiração, filtração e cloração com água.



### Exemplificando

Veja aqui um exemplo de separação mecânica aplicada aos frutos do café por meio de peneiras vibratórias. Disponível em: <<http://g1.globo.com/bahia/bahia-rural/videos/v/conheca-o-processo-de-classificacao-e-beneficiamento-dos-graos-de-cafe/3643058/>>. Acesso em: 2 nov. 2017.

Já a limpeza das cascas de frutos é feita a partir da imersão deles em água com concentração de cloro igual a 30ppm pelo tempo de 15 a 30 minutos, responsável por reduzir a microbiota que naturalmente contamina a superfície.

Também é feita a remoção das partes indesejáveis, não aproveitadas ou aplicáveis, como cascas, caroços, couro, caule (dependendo da origem da matéria-prima). Essas partes podem ser separadas das demais de interesse ou produzidas a partir da desintegração da matéria-prima.

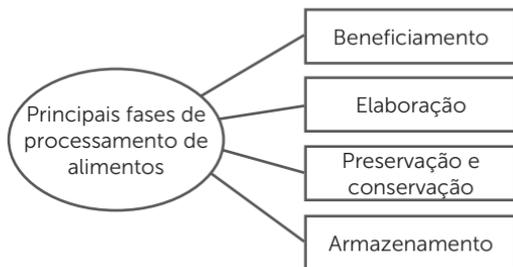
Os processos de extração, despolpamento, moagem, trituração, centrifugação, aspiração, filtração, peneiração, etc., são exemplos de processos aplicados na separação da parte de interesse dos produtos daquelas que constituirão o resíduo; então, as matérias-primas preparadas podem entrar na formulação do produto.

### Fases do processamento de diferentes tipos de alimentos e embalagens

Como já vimos, o processamento de alimentos é específico a cada tipo de produto que se deseja obter, mas, de forma geral, todos os processos de industrialização seguem algumas etapas em comum.

A Figura 2.2 apresenta um esquema com as principais fases do processamento da indústria de alimentos.

Figura 2.2 | Fases de processamento da indústria de alimentos



Fonte: adaptada de Evangelista (2008).

O beneficiamento consiste na manipulação da matéria-prima de acordo com suas características e seu destino de processamento. Inclui as etapas de limpeza, higienização, separação de partes não comestíveis, entre outras, como foi visto antes.

A remoção dessas partes aumenta a estabilidade microbiológica do alimento, removendo microrganismos ou parasitos que são encontrados contaminando cascas, e também enzimas responsáveis por reações que deterioram a qualidade dos produtos.

As partes rejeitadas da matéria-prima muitas vezes são consideradas como resíduo para a indústria de alimentos, e mais recentemente têm sido reaproveitadas e usadas na elaboração de outros produtos.



### Exemplificando

Um estudo científico utilizou resíduos das indústrias de processamento de frutas na produção de geleias, doces em calda e em massa. Alguns dos métodos e resultados podem ser vistos no trabalho *Utilização de casca de banana na fabricação de doces de banana em massa - avaliação da qualidade*. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1235/862>>. Acesso em: 18 out. 2017.

A fase de elaboração é de maior importância na fabricação do alimento, pois nela são aplicadas várias tecnologias que geram as transformações e diferentes características de cada alimento.

A tabela a seguir mostra os principais processos tecnológicos utilizados na fase de elaboração.

Tabela 2.1 | Tecnologias empregadas na elaboração de alimentos

Processos	Operações
Físicos	Moagem Trituração Prensagem Aplicação de calor
Químico	Extração por solvente Acidificação Uso de aditivos Salga
Físico-químicos	Refinação Hidrolização Dissolução Emulsificação Caramelização Cristalização
Biológicos	Fermentação Maturação

Fonte: Evangelista (2008).

Os meios de conservação dos produtos alimentícios são aplicados durante todo momento do processamento, seja pelo uso de calor

ou adição de um conservante, por exemplo. Porém, a fase de preservação e conservação, por ser específica, permite o controle da microbiota deteriorante e eliminação patogênica, garantindo à indústria de alimentos maior tempo de vida útil aos produtos e maior alcance de mercados.

Os métodos que a indústria de alimentos utiliza para aumentar a vida de prateleira dos produtos são: a conservação pelo uso do calor, capaz de destruir células vegetativas e esporos dos microrganismos, assim como toxinas, dependendo da temperatura empregada, responsáveis pela secagem ou concentração dos produtos pela evaporação da água livre (usada nas reações metabólicas e no crescimento de microrganismos); o emprego do frio por meio de resfriamento ou congelamento, que reduz a atividade dos microrganismos e das enzimas do próprio alimento; o uso de açúcar, que concentra o alimento disponibilizando menos água às reações de deterioração; as fermentações, pela redução do pH do meio e colonização do alimento pelos microrganismos fermentadores benéficos; o uso de aditivos, conservadores, antioxidantes, estabilizantes e antiespumantes, por exemplo; a irradiação, que destrói microrganismos e enzimas; a salga, por eliminar água do alimento por meio de pressão osmótica; e alguns métodos inovadores, como uso de atmosfera modificada em embalagens, reduzindo a quantidade de oxigênio disponível para respiração microbiana e uso de alta pressão na destruição das membranas das células microbianas.

Vários métodos de conservação podem ser aplicados a um mesmo alimento. O armazenamento acontece sob condições que objetivam a preservação dos alimentos, assim, são controlados temperatura, umidade e ar atmosférico.

Alguns produtos são estáveis à temperatura ambiente e podem ser armazenados e comercializados dessa forma. Porém, outros são mais perecíveis e necessitam de armazenamento refrigerado, para controlar o desenvolvimento microbiano e as reações enzimáticas.

Os alimentos tendem a entrar em equilíbrio de umidade com o ambiente, absorvendo água quando a umidade atmosférica é maior, e perdendo água quando a umidade do ambiente é menor. Isso provoca alterações de textura, sabor e até favorece o desenvolvimento de microrganismos à medida que o produto se torna mais úmido.

O armazenamento também pode provocar a absorção de odores por alguns tipos de alimentos que apresentam facilidade para isso, como leite e derivados, enquanto outros produtos, alimentícios ou não, são agentes odoríferos, apresentam aroma forte e pronunciado. Deve-se evitar o acondicionamento desses tipos de alimentos juntos.

As embalagens, entre outras funções, atuam como barreiras físicas na solução dessas duas últimas questões, protegendo o alimento contra o ganho ou perda de água para o ambiente, bem como evitando a absorção de odores estranhos.

Além disso, elas também são veículos de marketing, apresentando o produto ao consumidor; proteções mecânicas, especialmente durante o transporte; proteções contra microrganismos, aumentando a vida útil dos alimentos; dão forma ao produto e apresentam informações importantes, como lista de ingredientes e tabela nutricional nos rótulos.

Os materiais utilizados como embalagem de alimentos são variados, podendo ser metal, vidro, papelão e madeira (como embalagem secundária, que não entra em contato direto com o alimento), plásticos rígidos, laminados mistos, garrafas e recipientes plásticos, celofane, alumínio e papel.



### Assimile

O importante é determinar qual o melhor tipo de embalagem para cada tipo de alimento, que será capaz de manter suas características, proteger, aumentar a vida útil e não interagir de forma a passar seus componentes para ele. A indústria alimentícia busca conciliar essas características a um bom preço e uma boa apresentação do produto.



### Pesquise mais

Assista ao vídeo sobre o processamento de polpa de frutas, desde a recepção, lavagem e desinfecção dos frutos, até a aplicação de processos de cozimento, despulpamento, envase e selagem das embalagens que serão congeladas e comercializadas dessa forma. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=Jm4IWleM344>>. Acesso em: 18 out. 2017.

## Controle de qualidade

O controle de qualidade faz parte das indústrias de alimentos como um setor composto por funcionários qualificados nas atividades que

o compõe. É um sistema de proteção para quem produz e consome o alimento, pois tem como principal objetivo garantir ao industrial a fabricação de alimentos de excelente padrão e oferecer ao consumidor produto seguro que cumpre a finalidade de alimentar e nutrir.

Dependendo da estrutura e do porte da empresa, o departamento de controle de qualidade pode ser formado por diferentes unidades, que envolvem laboratório para análises de matérias-primas e produtos finais, reconhecimento e avaliação de falhas; depósito ou câmara fria para estocagem de amostras coletadas; escritório para o armazenamento dos documentos de controle, estudos e planos de trabalho, dados de cadastramento, de especificação e do processamento de produtos de fabricação.

Esse departamento deve ser gerenciado por profissional com formação na área, e é frequentemente alvo de auditorias externas, devendo responder ao órgão fiscalizador responsável (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ou Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por isso a necessidade de registro de todas as atividades.



### Pesquise mais

Conheça as funções do departamento de controle de qualidade consultando a Circular 175, de 16 de maio de 2005, DIPOA/MAPA, que descreve pontos de autocontrole, desde a manutenção de instalações e equipamentos industriais a testes microbiológicos que garantem a segurança e qualidade da matéria-prima e do produto final.

As atividades do controle de qualidade são conduzidas de acordo com diferentes pontos de vista.

Sob o ponto de vista de obtenção do produto, procura-se fazer uma verdadeira radiografia do produto, conseguida a partir do acompanhamento e controle de todas as etapas de produção, desde escolha e qualidade da matéria-prima até seu armazenamento. Isso envolve o conhecimento de contaminação inicial dos ingredientes, a fidelidade à execução da formulação, o controle de parâmetros de processo como temperatura, tempo, pressão até a melhor embalagem, para manter as características e a temperatura de armazenamento do produto e garantir maior vida de prateleira a eles.

Os produtos alimentícios também devem ser avaliados quanto à aceitação dos consumidores. Esse fato é totalmente dependente da

sua constituição em ingredientes e elaboração, que influenciam nas características sensoriais e, principalmente, na padronização que mantém essas características de acordo com o que o consumidor está acostumado e espera do produto.

A avaliação sensorial pode ser feita por grupo de provadores recrutados e treinados entre funcionários da empresa que analisam, por diversas metodologias, características sensoriais dos produtos, como cor, sabor, aroma e textura.

Por fim, o controle de qualidade apresenta seus pontos de interesse para os produtores de alimentos; respalda o industrial no fornecimento de produtos padronizados dentro das especificações das legislações aplicáveis a eles; exclui ocorrências negativas capazes de causar má impressão ao produto, assim como a implantação de melhorias, adoção de novas tecnologias que melhoram o processo como um todo, bem como o produto final.

Todas as atividades do Controle de Qualidade são planejadas e executadas diariamente, cumprindo eficiente programa de ação.

## Sem medo de errar

E agora que você aprendeu como processar alimentos e quais técnicas geralmente são aplicadas em diferentes fases, você consegue ajudar o agricultor Francisco?

Talvez a primeira resposta que nos venha à cabeça seja processar esses pepinos para que eles tenham um aumento de vida útil; no entanto, aprendemos que isso pode ser feito de diversas formas.

Francisco fez a colheita, a limpeza manual dos pepinos (separando folhas e terra) e seguiu para a lavagem e desinfecção das cascas por meio de esponja, detergente neutro e imersão do produto em solução clorada a 30ppm por 15 minutos, a fim de reduzir parte da contaminação microbiana deteriorante que esse produto apresenta pelo simples fato de ser do campo, da terra; em seguida, os vegetais foram descascados e cortados, obtendo produtos já prontos ao consumo. Diante disso, entre as várias técnicas de processamento de alimentos, uma pode ser escolhida por ele para manter as propriedades sensoriais agradáveis do produto e aumentar sua estabilidade durante o armazenamento; no entanto, o senhor Francisco não precisa mais encarar essa situação

como um problema, muito pelo contrário, ele terá oferta de pepinos em grande parte do ano. Por enquanto, ele opta por armazenar os pepinos em uma embalagem adequada, plástica de polipropileno (PP), que protege o alimento do ambiente externo e mantém as características e uma menor carga microbiana (que o produto adquiriu durante o processamento) por atuar como barreira física. Os resultados conseguidos por Francisco foram ainda melhores quando armazenou esses produtos embalados sob temperatura de refrigeração ( $0 < T < 10$  °C).

## Faça valer a pena

**1.** A descoberta dos métodos de conservação de alimentos permitiu grandes avanços à indústria de alimentos e maior comodidade aos consumidores, garantindo o abastecimento de produtos mesmo fora de época de produção, o que é comum a algumas culturas vegetais, classificadas como produtos sazonais.

Assinale a alternativa que apresenta tecnologia empregada na preservação e conservação de produtos alimentícios.

- a) Colheita.
- b) Transporte.
- c) Congelamento.
- d) Adubação.
- e) Avaliação sensorial.

**2.** O processamento de alimentos é capaz de transformar matérias-primas em inúmeros e diferentes produtos, ofertando no mercado alimentos diferenciados e com vida de prateleira estendida em decorrência de etapas que controlam e/ou reduzem as reações enzimáticas e microbiológicas.

De forma geral, quais são as etapas que compõem o processamento de alimentos?

- a) Beneficiamento, elaboração, conservação e preservação e armazenamento.
- b) Beneficiamento, elaboração, conservação, armazenamento e transporte.
- c) Beneficiamento, elaboração e distribuição.
- d) Plantio, adubação, colheita e elaboração.
- e) Plantio, colheita, elaboração, conservação e armazenamento.

**3.** A indústria de alimentos, assim como qualquer outra do ramo industrial, é dividida em setores que visam a um trabalho direcionado para otimizar suas atividades. No caso de alimentos, especificamente, muitos desses setores

trabalham no sentido de produzir alimentos com qualidade microbiológica e segurança alimentar.

Se uma indústria alimentícia apresenta problemas no sentido de fornecer ao mercado consumidor produtos que apresentam contaminação microbiana excessiva dentro do prazo de validade estipulado para ele e decide fazer um rastreamento das etapas de processamento em que essa contaminação pode estar acontecendo, qual setor seria responsável por essa triagem?

- a) Setor industrial.
- b) Controle de qualidade.
- c) Administrativo.
- d) Gerência geral.
- e) SAC: serviço de atendimento ao consumidor.

## Seção 2.2

### Biotecnologia de alimentos

#### Diálogo aberto

Bem-vindo, aluno!

Já estudamos biotecnologia e tecnologia de alimentos; vimos as formas de manipular material genético, organismos e alimentos; conhecemos as características dos processos, bem como seus objetivos, vantagens e desvantagens. E se agora juntarmos esses dois conhecimentos?

É exatamente o que vamos ver nesta seção de estudo, a biotecnologia aplicada à produção de alimentos, principalmente por meio do uso de microrganismos. É interessante, simples de entender e de fazer, e dá origem a vários alimentos que consumimos diariamente.

Vamos continuar a analisar a situação do pequeno agricultor, Francisco, que ainda busca por soluções para sua grande produção de pepinos transgênicos, que continuou a aumentar nos meses subsequentes.

Francisco conversou com uma das vendedoras da feira local que lhe sugeriu a fabricação de pepinos em conserva, produto também conhecido como pickles. No entanto, a vendedora apenas conhecia o produto, mas não sabia como produzi-lo. Então, Francisco foi em busca de profissionais que pudessem ajudá-lo, e foi instruído a produzir conservas fermentadas. Como você explicaria as características dos processos fermentativos a ele? Por que as sementes de pepino transgênico adquiridas por ele podem ter elevado o rendimento do produto?

#### Não pode faltar

##### Conceitos e histórico da biotecnologia de alimentos

Você se lembra do conceito de biotecnologia que vimos no início dos nossos estudos?

Só para lembrar: são as tecnologias aplicadas aos organismos vivos.

Aqui, o conceito continua o mesmo, porém, agora, essas biotecnologias são aplicadas à produção de alimentos.

O processamento de alimentos também apresenta os mesmos objetivos e vantagens que estudamos na seção anterior, produzindo muitos produtos, aproveitando subprodutos e aumentando a vida de prateleira dos alimentos.

Com o uso de biotecnologias, o aumento do prazo de validade dos alimentos é conseguido não só pela aplicação das etapas de conservação e preservação, por meio da adição de conservantes e do uso de baixas e altas temperaturas, por exemplo, mas também pela adição de microrganismos benéficos aos alimentos.

Esses microrganismos, que algumas vezes entram como ingredientes na elaboração de alimentos para que sejam conseguidos sabores, odores e propriedades tecnológicas específicas, também são responsáveis por colonizarem o meio concorrendo com microrganismos indesejáveis, deteriorantes e patogênicos.

A biotecnologia realmente teve seu início, mesmo que acidentalmente, na produção de alimentos. Com uma história de mais de 10.000 anos, os alimentos armazenados pelo homem sofriam ação da microflora naturalmente presente neles, dando origem aos produtos fermentados.

A Bíblia Sagrada, um dos livros mais antigos do mundo, relata muitas histórias em que Jesus e seus apóstolos consumiam pães e vinho, produtos obtidos a partir do uso de microrganismos. Os antigos egípcios deixaram registros do consumo de cerveja, bebida de cereal fermentado, e hoje sabe-se que existiam ao menos 17 tipos desse produto.

Com o avanço do conhecimento científico, as biotecnologias também evoluíram e permitiram a produção de alimentos em escala industrial, o controle de todo o processo e a obtenção de produtos padronizados e de alta qualidade.

Hoje existe uma variedade muito grande de produtos alimentícios no mercado obtidos por essas técnicas.



### Exemplificando

O pão e o vinho, como já comentamos, são alimentos obtidos por fermentação microbiana, assim como leites fermentados, iogurtes, alguns tipos de queijos, cerveja e bebidas destiladas, salame, pickles e chucrutes

(à base de vegetais), até a produção de aminoácidos destinados à alimentação animal e à dietas humanas com fins especiais são obtidos pelo uso de microrganismos.

Mais recentemente, com as modernas técnicas de biologia molecular, os alimentos geneticamente modificados e transgênicos podem agregar características que aumentam a produtividade, aumentando safras que melhoram a composição nutricional ou qualquer outro objetivo específico que se queira conseguir.



**Refleta**

Você, como consumidor, que alimento transgênico desenvolveria? Com qual objetivo?

### **Definições e histórico dos processos fermentativos**

Você percebeu que ao falarmos de biotecnologia de alimentos os principais produtos obtidos são os fermentados? Até porque são os mais antigos e por isso possuem técnicas mais consagradas.

Mas afinal, o que é um alimento fermentado?

Ao adicionarmos um microrganismo a um alimento ou simplesmente ao permitirmos que a microflora desse alimento atue sobre ele, esses seres vivos passam a utilizar os nutrientes do alimento para seu desenvolvimento e sua manutenção de vida.

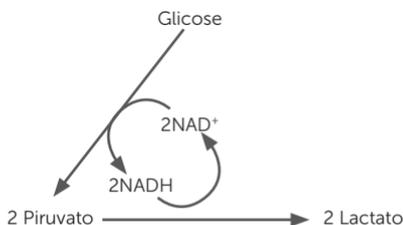
Assim como nós, eles precisam de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato), que é conseguida pelo processo de respiração celular. O principal substrato utilizado no processo de respiração é o açúcar, de diferentes fontes, convertido à glicose. Porém, na escassez de oxigênio ou mesmo na presença dele, alguns microrganismos apresentam a capacidade de obter ATP rapidamente a partir da glicose sem realizar a respiração celular completa, apenas com o processo de glicólise (primeira etapa da respiração celular independente de oxigênio).

A glicólise produz, além de dois ATPs para a célula microbiana, duas moléculas de piruvato, que serão metabolizadas em diferentes compostos de acordo com o tipo de fermentação. Isso quer dizer que na fermentação láctica o piruvato é convertido a ácido láctico, enquanto na fermentação alcoólica é transformado em etanol e  $\text{CO}_2$ , por exemplo.

A concentração desses compostos na matriz do alimento gera sabor, odor e características tecnológicas específicas.

Veja na Figura 2.3 o esquema da transformação da glicose na fermentação láctica.

Figura 2.3 | Conversão da glicose em lactato pelo processo de fermentação láctica



Esquema geral do processo de fermentação

Fonte: <<https://goo.gl/si6PPC>>. Acesso em: 17 out. 2017.



Pesquise mais

Conheça também o processo de fermentação alcoólica aplicado na produção de pães e bebidas alcoólicas acessando o vídeo *Fermentação alcoólica*. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=DF2AAWv-zXU>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

Hoje, a bioquímica da fermentação é conhecida e tem seus parâmetros de processo controlados pela indústria de alimentos, mas foi sem controle e conhecimento algum que surgiu o primeiro pão no Egito, há mais de 6.000 anos.

### Microrganismos fermentativos

Como já comentamos, alguns microrganismos são capazes de continuar seus processos de respiração para obter ATP mesmo na ausência de oxigênio; isso se dá por meio da glicólise, caracterizando o processo de fermentação ou, até mesmo, de meios que contenham esse gás.

Esses microrganismos são os de interesse para a realização dos processos fermentativos, especialmente os que realizam a fermentação na presença de oxigênio, podendo ser aplicados em meios sem a necessidade de controle do gás.

Para o uso em alimentos, além da capacidade fermentativa, os principais microrganismos utilizados são fungos e bactérias que apresentam as seguintes características:

1. Possui eficiência de conversão do substrato em produto.
2. Permite o acúmulo do produto no meio, de forma a obter sua elevada concentração no caldo fermentado; (não adianta nada um organismo que converte substrato também consumir todo o produto).
3. Ser homofermentativo, ou seja, apresentar um único produto de fermentação e não produzir substâncias incompatíveis com o alimento (assim se evita processos de filtração e purificação).
4. Não ser patogênico (facilitando muito o manuseio e evitando purificação).
5. Não exigir condições de processo muito complexas.
6. Não exigir meios de cultura caros.

Os microrganismos para uso industrial podem ser conseguidos por isolamento de recursos naturais em meios que eles aparecem naturalmente; comercializados como em coleções de culturas; obtidos de mutantes naturais ou mutantes induzidos por métodos convencionais, por reprodução direcionada, bem como pela obtenção de recombinantes por técnicas de engenharia genética.



### Exemplificando

Existem pelo menos 11 coleções de culturas de microrganismos de interesse industrial distribuídas em diversos países. O acesso a elas é facilitado pela internet; uma delas, a Coleção de Culturas Tropical, localizada na cidade de Campinas-SP, pode ser acessada no link a seguir. Disponível em: <<http://www.cct.org.br>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

Na produção de produtos fermentados à base de cereais (pães, bebidas fermentadas e fermento-destilladas), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo utilizado, por cumprir os critérios descritos acima, especialmente pela produção de etanol e CO<sub>2</sub>, produtos desejáveis.

Nos fermentados lácteos (leites fermentados, iogurtes e alguns tipos de queijos) é de interesse a obtenção do ácido láctico, conseguida

pela ação de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre o açúcar do leite.

Os produtos cárneos fermentados são obtidos pela adição de açúcar como ingrediente, uma vez que carnes são fontes ruins de carboidratos. Os microrganismos normalmente aplicados na formulação desses produtos, denominados culturas starter, por iniciarem o processo fermentativo, também são do gênero *Lactobacillus*. A produção de ácido láctico nesses produtos é desejável porque é o ácido acumulado na carne durante a conversão bioquímica do músculo em carne e, portanto, associado ao sabor do produto que estamos acostumados.

No caso dos fermentados cárneos, ainda é desejável que os microrganismos sejam tolerantes ao sal e ao conservante nitrito, normalmente utilizados nas formulações dos produtos.

Na obtenção de vinagre, usa-se uma microflora mista de *Acetobacter* capaz de produzir ácido acético como produto principal da fermentação.

Dessa forma, entre fungos, leveduras e bactérias, escolhe-se os microrganismos principalmente de acordo com o produto que se deseja obter.

### **Aplicação dos processos fermentativos na indústria de alimentos**

Com tudo que estudamos até agora, já deu para ter uma pequena ideia dos alimentos em que são aplicados os processos fermentativos. Mas as aplicações são ainda mais extensas e divididas da seguinte forma:

- 1) Massas fermentadas (pães; panetone).
- 2) Carnes fermentadas (salame, linguiça).
- 3) Bebidas fermentadas (cerveja, vinho).
- 4) Bebidas destiladas (aguardente, uísque).
- 5) Leite fermentado (iogurte, queijo).
- 6) Vegetais fermentados (pickles, chucrute).
- 7) Enzimas (proteases, amilases, glicose oxidase).
- 8) Condimentos (vinagre, glutamato).
- 9) Aminoácidos (lisina, ácido glutâmico).
- 10) Polissacarídeos (dextrano).

Esses produtos são obtidos pela aplicação adequada de fermentação láctica, alcoólica, acética, butírica ou cítrica, classificadas de acordo com os produtos obtidos.

Como já comentamos alguns desses produtos, vamos avaliar a produção de vegetais fermentados e de vinagre para termos ideia de outros tipos de processo.

Os vegetais fermentados dão origem aos produtos chamados pickles, chucrute e azeitona. O pickles é aquele que o agricultor Francisco foi aconselhado a produzir para aproveitar a produção de pepino, lembra?

A base do pickles é uma hortaliça submetida à fermentação láctica e uma fonte de glicose, frutose e sacarose para os microrganismos fermentadores, que podem ser *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e/ou *Streptococcus*.

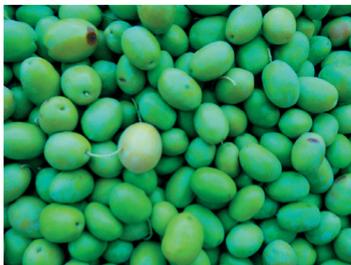
O chucrute é feito a partir das folhas do repolho submetidas a condições que permitem a fermentação da microflora natural presente, *Leuconostoc mesenteroides*, o *Lactobacillus brevis* e o *Lactobacillus plantarum*.

E você sabia que a azeitona é um fruto rígido da oliveira que não é agradável de se consumir *in natura* por ser mais duro e amargo? O processo de fermentação láctica é responsável pelo desenvolvimento do sabor característico que conhecemos para o produto, assim como pela ação dos microrganismos sobre as paredes celulares do fruto, tornando o alimento mais macio e desenvolvendo seu sabor característico.

Veja a diferença da azeitona verde *in natura* apresentada na Figura 2.4 (A) para a azeitona fermentada em conserva, aquela que estamos acostumados a consumir, mostrada na Figura 2.4 (B). A própria aparência do fruto passa por alterações.

Figura 2.4 | (A) Fruto da oliveira, azeitona *in natura*; (B) azeitona fermentada em conserva

(A)



(B)



Fonte: <<https://goo.gl/Pd64EG>>; <<https://goo.gl/FM5n2s>>. Acesso em: 21 out. 2017.

Os vegetais fermentados podem ainda ser mantidos em conserva, ou melhor, em um meio com mistura de ingredientes (sal, azeite, vinagre) que favorecem sua conservação e seu sabor, além de controlar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e permitir o desenvolvimento dos fermentadores.

A fermentação microbiana também é responsável pela produção de vinagre de todos os tipos que conhecemos.

Vamos analisar o processo de obtenção de vinagre de álcool que passa por duas etapas de fermentação.

Na primeira, os microrganismos fermentam o açúcar em álcool, e na segunda acontece a fermentação acética com a conversão do álcool em ácido acético, produto concentrado do vinagre.

Para cada fermentação são utilizados microrganismos específicos, de acordo com o tipo de produto que se deseja obter.

Assim, na primeira etapa são aplicadas leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces* por serem produtoras de álcool, e na segunda são empregadas bactérias do gênero *Acetobacter* capazes de formar o ácido acético a partir de álcool na presença de ar.



### Assimile

Cada tipo de microrganismo utiliza melhor determinado tipo de substrato, dando origem a produtos específicos. Esses produtos classificam a fermentação como láctica, acética, alcoólica, butírica ou cítrica.

## Conceito, histórico e utilização de matérias-primas transgênicas na produção de alimentos

Os alimentos transgênicos são matérias-primas de origem vegetal ou animal que tiveram a adição de um ou mais genes de outra espécie em seu genoma, ou alimentos obtidos a partir da mistura de vários ingredientes, sendo pelo menos um deles transgênico.

Vimos no início dos nossos estudos que, em 1998, a CTNBio liberou o plantio da soja transgênica *round up ready* em território nacional. Essa nova planta trazia em seu genoma gene oriundo de uma bactéria de solo (*Agrobacterium*), patenteado por uma empresa privada com o nome de CP4-EPSPS, que confere maior resistência ao herbicida glifosato. O que essa característica trazia de vantagem? Os produtores de soja poderiam aplicar o produto em quantidades suficientes para combater as ervas daninhas das lavouras enquanto a planta da soja se manteria em perfeito desenvolvimento, sem ser prejudicada pelo herbicida.

Mas você sabia que desde um ano após essa autorização até hoje os alimentos transgênicos são alvo de muitos questionamentos?

Isso porque, se pensarmos só no caso da soja transgênica, o uso indiscriminado do pesticida glifosato poderia causar contaminação de solos e lençóis freáticos, além de um desequilíbrio ambiental extinguindo algumas espécies vegetais.



### Refleta

Você, com seu conhecimento de genética, ainda pode pensar em outras questões associadas aos organismos transgênicos. Poderia o gene de uma outra espécie carregar para o organismo transgênico informações ocultas aos cientistas e promover efeitos desconhecidos e até indesejáveis?

Mesmo diante de muitos questionamentos, polêmica e até impedimento judicial, foi liberado o plantio de culturas transgênicas, que trazem muitos benefícios aos agricultores e produtores de alimentos, como o aumento da produtividade, da resistência a pragas e variações climáticas e o enriquecimento nutricional do alimento.

Vendo nessas vantagens uma grande oportunidade, o agricultor Francisco adquiriu sementes de pepino transgênico e aumentou muito sua produção.



## Exemplificando

O feijão, uma leguminosa que não apresenta em sua composição química todos os aminoácidos essenciais aos seres humanos, poderia receber o gene da castanha-do-pará codificador de metionina, faltante no feijão.

Até o ano de 2017, nosso país apresenta a segunda maior área mundial destinada ao plantio de transgênicos, com destaque para a produção de soja, milho e algodão. Mais recentemente, foi aprovado o cultivo de batatas e maçãs transgênicas, nas quais o transgene reduz a probabilidade de danos ou apodrecimento.

Você se lembra de uma das questões que tratamos no início desta unidade sobre a perda de alimentos? Esse transgene seria uma opção para a solução do problema, não acha?

Essas culturas, quando manipuladas pelas indústrias de alimentos, darão origem a outros alimentos também transgênicos.

Assim, a soja transgênica pode ser comercializada dessa forma, ou ser utilizada na extração do óleo de soja, na produção da proteína texturizada de soja, que por sua vez pode entrar como ingrediente de um hambúrguer bovino. Todos esses produtos são transgênicos.

A legislação brasileira estabelece que a presença desses alimentos ou ingredientes deve ser informada aos consumidores, até como decorrência das polêmicas ainda existentes; dessa forma, o consumidor consciente de que determinado produto é transgênico, pode decidir por consumi-lo ou não.

A Figura 2.5 mostra o símbolo que deve fazer parte das embalagens de alimentos transgênicos para que o consumidor possa identificá-lo como tal.

Figura 2.5 | Símbolo de transgênico no Brasil



Fonte: <<https://goo.gl/xZu984>>. Acesso em: 21 out. 2017.

## Sem medo de errar

Vamos ajudar o agricultor Francisco, que temos acompanhado com seu dilema de ter produzido muitos pepinos e não saber como conservá-los.

Um gene de alguma outra espécie foi inserido no genoma do pepino e foi responsável por produzir muito mais frutos por planta, aumentando a produtividade.

Agora, com grande quantidade de pepinos, ele é aconselhado a fazer pickles.

O pickle é uma conserva fermentada à base principalmente de pepinos. O produto é lavado e sanitizado, cortado em fatias finas, colocado em conserva, que pode conter sal, vinagre, açúcar, azeite, e armazenado por pelo menos 5 dias até ser consumido.

Essa é uma receita que você pode encontrar na internet, mas, com seu conhecimento de biotecnologia de alimentos, agora você é capaz de entender por que o produto deve ficar armazenado pelo prazo mínimo de 5 dias até ser consumido. Esses são os dias destinados à fermentação.

Apesar de não termos adicionado nenhuma cultura microbiana como ingrediente, o pepino apresenta contaminação natural, que permite o desenvolvimento desses microrganismos que realizarão fermentação láctica e atuarão sobre a estrutura do pepino, conferindo as propriedades sensoriais que esperamos no alimento.

O problema do Francisco foi bem mais fácil de resolver do que ele imaginava, não acha?!

## Avançando na prática

### Desenvolvimento de um alimento transgênico

#### Descrição da situação-problema

Imagine que foi identificado um problema de crescimento em determinada população do nosso país.

Todos os habitantes de uma mesma região apresentavam altura média muito menor que da população brasileira e passaram a ser estudados.

Depois de alguns anos de pesquisa, detectaram a falta de um aminoácido essencial na dieta dessa população, que tem sua base

no consumo de arroz – aminoácido formador do hormônio de crescimento.

Como o arroz é a cultura que predomina na região como decorrência de tipo de solo e clima, além de ser um produto mais acessível para a população de baixa renda, como esse problema poderia ser resolvido?

### Resolução da situação-problema

De acordo com o que aprendemos nesta seção, seria possível o desenvolvimento de um arroz transgênico adicionado de gene codificante do aminoácido deficiente.

Uma espécie que produza esse aminoácido seria identificada e o gene isolado e inserido no genoma do arroz, fazendo com que as novas plantas passassem a produzi-lo.

## Faça valer a pena

**1.** O processo de fermentação dos alimentos teve seu início acidentalmente há mais de 10.000 anos, a partir da flora microbiana naturalmente presente nos alimentos. Com o conhecimento dos microrganismos e avanços das técnicas de processamento, hoje a fermentação é feita com rígido controle pela indústria alimentícia e produz uma grande variedade de produtos. Dentre os alimentos listados a seguir, marque a alternativa que apresenta todos aqueles produzidos por processos de fermentação.

- a) Açúcar, vinagre, leite.
- b) Vinagre, pão, cerveja.
- c) Pão, biscoito, bolacha.
- d) Vinho, macarrão, queijo.
- e) Salsicha, salame, chouriço.

**2.** O pão é um dos alimentos fermentados mais antigos do mundo, produzido pela primeira vez no Egito há mais de 6.000 anos e, até hoje, é base da alimentação de muitas culturas e apreciado por muitos consumidores. Dentre as alternativas abaixo, assinale a que apresenta o tipo de fermentação que ocorre durante a produção de pães.

- a) Butírica.
- b) Acética.
- c) Lática.
- d) Alcoólica.
- e) Cítrica.

**3.** Os alimentos transgênicos são obtidos a partir de matéria-prima transgênica ou pelo uso de um ingrediente transgênico na formulação. Ainda não são conhecidos todos os efeitos do transgene no meio ambiente e no organismo, tanto de quem o consome como daquele que recebe o gene, por isso, esses alimentos têm sido alvo de muita polêmica. Sobre alimentos transgênicos, suas características e obrigações, assinale a alternativa correta.

- a) No Brasil é dispensável informar a presença de ingredientes transgênicos nos rótulos dos produtos.
- b) Os alimentos transgênicos são sempre desenvolvidos com o objetivo de aumentar vida de prateleira.
- c) A soja transgênica *round up ready* foi criada para resistir aos climas quentes, resistindo às condições de plantio do Centro-Oeste brasileiro.
- d) Alimentos transgênicos podem ser cultivados e comercializados sem aprovação prévia no Brasil desde o ano de 1980.
- e) Os produtos derivados de uma matéria-prima transgênica, como o fubá produzido de um milho transgênico, também são classificados como alimento transgênico.

## Seção 2.3

### Aplicações tecnológicas e biotecnológicas nos alimentos e meio ambiente

#### Diálogo aberto

Após a produção de picles de pepino, que apresentou sabores e odores diferenciados além de maior vida útil, e a ótima aceitação do produto por seus familiares, Francisco se interessou pelo processamento de alimentos e passou a se questionar sobre como poderia obter mais produtos a partir das matérias-primas que possui em seu sítio. Ele fez um levantamento de tudo que gostaria de processar e aproveitar e levou a lista até você, para que pudesse auxiliá-lo nesta empreitada. Nessa lista, estavam descritos: leite de vaca, carne suína, trigo, uva e mel. Você, como profissional, com formação na área e amigo de Francisco, decide auxiliá-lo escrevendo uma cartilha com o passo a passo de como processar essas matérias-primas e seus subprodutos, porém, o material deve ser extremamente explicativo e de fácil compreensão. Então, para facilitar o entendimento do processamento e de novas tecnologias aplicadas à produção de alimentos, aliado ao material escrito, você organiza uma palestra que será destinada aos pequenos agricultores da região. Como começar? Quais os processos aplicados ao leite, carnes e pescados, grãos e cereais, frutos e produtos açucarados utilizados pela indústria de alimentos? Como Francisco pode otimizar a utilização de suas matérias-primas e ainda produzir energia para seu próprio sítio?

#### Não pode faltar

##### Processos tecnológicos e aplicação da biotecnologia - leite e derivados

Nas duas primeiras seções desta unidade vimos as aplicações da tecnologia e biotecnologia de alimentos e, muitas vezes, citamos exemplos de produtos comuns em nosso dia a dia.

Agora, queremos entender esses produtos com mais detalhes.

A produção de iogurte envolve as biotecnologias, pois acontece com a aplicação de microrganismos.

Quando se utiliza processos fermentativos e de aplicação de organismos vivos como ingredientes na produção de alimentos, é muito importante garantir a qualidade da matéria-prima. Qualquer contaminação indesejada pode contaminar o meio com produtos diferentes daquele obtido pelo processo de fermentação e alterar as características tecnológicas e sensoriais do produto, além de comprometer sua qualidade microbiológica.

Para isso, o leite deve passar por, no mínimo, uma pasteurização lenta (90-95 °C/5 min.), que consiste em elevar a temperatura do alimento por determinado período de tempo e depois abaixá-la (12/18 °C na produção de iogurte), com o objetivo de destruir microrganismos patogênicos e diminuir a carga deteriorante (aqueles que degradam o alimento).

O leite também pode ser padronizado em relação ao teor de gordura (em centrífugas) e sólidos solúveis (adição de leite em pó, açúcar) para garantir o padrão do produto final.

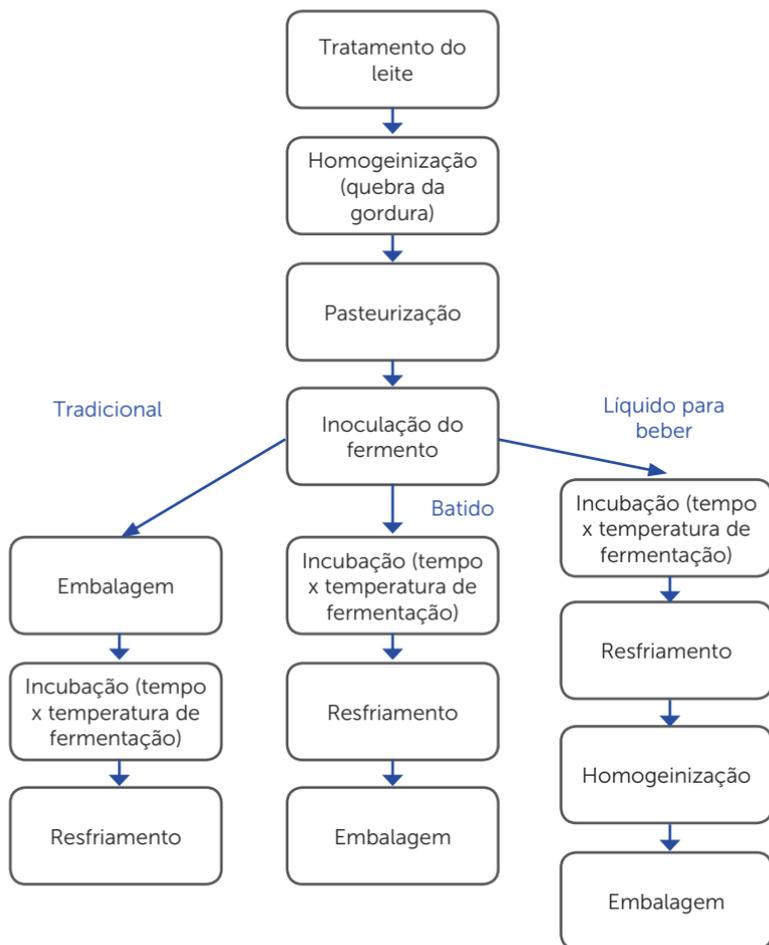
O processo de fermentação é feito pela adição de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* que atuam sobre o açúcar do leite (lactose), sob temperatura ótima em torno de 45 °C e por um período que varia de 3 a 5 horas, produzindo, como produto principal, ácido láctico.

O abaixamento do pH do meio, pelo acúmulo de ácido láctico, promove a insolubilização das proteínas do leite, que passam a formar coágulos.

Ao final do processo, o resfriamento se faz necessário (4 °C) para o próprio controle da atividade microbiana, sendo responsável por interromper os processos fermentativos.

Por três diferentes tecnologias, são obtidos os iogurtes classificados como tradicional, batido e líquido para beber, conforme mostrado no fluxograma abaixo.

Figura 2.6 | Fluxograma de obtenção de iogurtes tradicionais, batido e líquido para beber



Fonte: elaborada pelo autor.

Perceba que o que difere, basicamente, um tipo de iogurte do outro é a manipulação do produto. Quanto mais manipulado, menos consistente fica.

A adição de aromas e polpas de frutas também pode ser uma etapa na produção de iogurtes com sabores diferenciados.



Alguns tipos de queijo são produzidos por ação microbiana também, em um processo conhecido como coagulação enzimática, pois uma enzima é responsável pela quebra e coagulação da proteína do leite (caseína).

Veja o que é e como é feito o Kefir de leite acessando o link. Disponível em: <<http://probioticosbrasil.com.br/index.php/probioticos/kefir-de-leite/>>. Acesso em: 18 dez. 2017. O kefir nada mais é que uma colônia de microrganismos.

Veja também o processamento de requeijão, um queijo fundido, explicado a partir do subtítulo **Obtenção de massa básica para elaboração de requeijão por meio do processo de coagulação ácida do leite por fermentação láctica**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/queijos/requeijao-tecnologias-de-fabricacao-da-massa-basica-parte-1-91254n.aspx>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

Vale a pena ressaltar que a coagulação ácida é conseguida não só pelo resultado da fermentação láctica, como também pela adição direta de ácidos orgânicos no leite.

## Processos tecnológicos e aplicação da biotecnologia - carnes e derivados, pescado e derivados

Assim como o iogurte, o salame é um exemplo típico de derivado cárneo fermentado. É produzido a partir da mistura de carnes bovinas e suínas porcionadas com gordura (toucinho), sal, conservante, condimentos, cultura microbiana fermentativa, também chamada cultura starter, e embutido em uma tripa artificial (celulósica, colágeno) ou natural (intestinos) para ganhar formato.

Na produção de salame, além da qualidade da matéria-prima, é importante que os microrganismos apresentem capacidade de se desenvolverem em ambiente adicionado de sal e do conservante nitrito, mais utilizado em produtos cárneos.

Esses microrganismos realizam fermentação láctica a partir dos poucos açúcares existentes na carne e, principalmente, do açúcar (sacarose) adicionado como ingrediente.

O acúmulo de ácido láctico no produto gera textura, sabor e aroma característicos de salame.

Além dos microrganismos fermentadores do salame (*Lactobacillus*), durante o período de secagem e maturação do produto, sob condições controladas de temperatura e umidade, ocorre o desenvolvimento de fungos na superfície, o *Penicillium nalgiovense*, de aspecto branco, totalmente seguro ao consumo e até desejável, pois agrega sabor aos produtos maturados por tempo prolongado, pela quebra de proteínas e gordura, liberando ácidos graxos voláteis e aminoácidos livres.

A figura a seguir apresenta a superfície de um salame tomada por fungos durante o período de maturação.

Figura 2.7 | Colonização da superfície de salames por fungos



Fonte: <<https://goo.gl/m8H4DN>>. Acesso em: 25 out. 2017.

Normalmente é feita a lavagem da casca do salame para a remoção das colônias de fungos, uma vez que muitos consumidores associam a aparência a um alimento inadequado ao consumo.

E você sabia que existe uma forma prática de identificar se os fungos que colonizaram o produto são benéficos? É justamente pela cor. Os fungos brancos são os desejáveis, se existir os de coloração cinza e preta, é porque o produto está contaminado e inadequado ao consumo.

Algumas linguiças e o chouriço, tendo o sangue como ingrediente principal, também são exemplos de produtos cárneos fermentados.

Além dos fermentados, existe uma variedade muito grande de derivados cárneos.



Os derivados cárneos são classificados em grandes grupos, de acordo com o processo tecnológico principal. Dessa forma, temos produtos classificados como reestruturados, aqueles que foram cortados e depois reconstituídos em uma nova forma, como linguiças e hambúrgueres; os emulsionados, nos quais temos como exemplo típico a salsicha, que forma uma emulsão de toucinho em água estabilizada pelas próprias proteínas da carne; os curados, adicionados dos sais de cura nitrito e nitrato; os salgados, que normalmente são defumados, adquirindo características típicas do produto e estendendo o prazo de validade; e os fermentados.

É importante saber que o mesmo produto pode ser classificado em mais de um desses grupos. O salame, do nosso exemplo, é reestruturado e fermentado.

Os pescados também podem ser submetidos a todos os processos de industrialização mencionados, dando origem a salsichas de peixe, peixes salgados e defumados, dentre outros.

## Processos tecnológicos e aplicação da biotecnologia - grãos e derivados

Você sabia que os grãos são as sementes das plantas responsáveis pela germinação e formação de uma nova vida, e podem ser de diferentes espécies?

O grão de trigo, classificado como cereal, porque cresce em espigas das gramíneas, produz a farinha de trigo e, por sua vez, os pães – produto amplamente difundido em todo o mundo.

A farinha é produzida em moinhos a partir das sementes que foram secas até umidade aproximada de 12%.

Na produção de pães, normalmente é empregado o processo de fermentação com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que utilizam os açúcares simples (glicose) provenientes do amido do cereal no processo de fermentação alcoólica, produzindo, principalmente, etanol e  $\text{CO}_2$ .

O que garante as propriedades tecnológicas típicas do pão, como maior volume e miolo macio, é a formação da rede de glúten (proteínas glutetina e gliadina) durante o processo de batimento e sova da massa, que apresenta elasticidade e, por isso, sofre processo de expansão

durante a liberação de gases durante o processo de fermentação. Esse fato promove o crescimento da massa e, durante o assamento, as proteínas desnaturam, tornando fixas essas estruturas no miolo do pão.

Na figura a seguir pode-se observar a massa de pão durante o descanso para que aconteça o processo de fermentação, e a rede de glúten estabilizada depois que o produto foi assado.

Figura 2.8 | (A) Fermentação da massa de pão e (B) estrutura do glúten estabilizada pela temperatura de assamento

(A)



(B)



Fonte: <<https://goo.gl/N8vPG8>>; <<https://goo.gl/flxZk1>>. Acesso em: 26 out. 2017.

Durante o processo (A) acontece o crescimento da massa, que você pode perceber fazendo pães em casa; em (B) podemos perceber os furos na massa, formados pela passagem dos gases da fermentação pela estrutura da rede de glúten.



### Exemplificando

Além do trigo, outros cereais são amplamente consumidos, como o milho e o arroz, base da alimentação do brasileiro junto a outro grão, o feijão, classificado como uma leguminosa, pois cresce em vagens.

A soja, que garante ao nosso país posição de destaque no cenário mundial, também é uma leguminosa que produz sementes, assim como o amendoim e a ervilha.

Esses grãos ainda podem ser submetidos às técnicas da indústria de alimentos originando os derivados, como fubá (milho), conservas (ervinha), proteína texturizada (soja), etc.

## **Processos tecnológicos e aplicação da biotecnologia - frutas e hortaliças**

O processamento de hortaliças dá origem ao pickles, que o agricultor Francisco produziu e que já comentamos na seção anterior.

Esse é um produto fermentado e adicionado de conserva.

Para ensinarmos ao Francisco como fazer pickles, não basta falarmos sobre fermentação, precisamos também passar a ele uma receita dos demais ingredientes a serem utilizados.

Uma conserva de pickles é feita com a adição de vinagre, sal e açúcar. O vinagre e o sal auxiliam na conservação do produto pela redução do pH e aumento da pressão osmótica, respectivamente, enquanto o açúcar é o alimento dos microrganismos fermentadores.

Outros ingredientes também podem ser adicionados com o objetivo de conferir sabor. Pimenta e orégano são amplamente utilizados.

O produto deve ser armazenado sob refrigeração por pelo menos 5 dias para que a fermentação completa aconteça e haja acúmulo dos seus produtos.

Além de processos fermentativos, várias outras tecnologias são aplicadas às frutas e hortaliças, aumentando sua vida útil e produzindo alimentos diversificados.



### **Exemplificando**

Polpa de frutas, doces em massa, barra ou calda e geleias são exemplos de produtos obtidos a partir da industrialização de frutas.

As hortaliças podem ser comercializadas como minimamente processados; conservas e ingredientes de outros produtos preparados, cozidos ou congelados.

O desenvolvimento dos minimamente processados trouxe facilidade para a vida das mulheres que passaram, cada vez mais, a trabalhar fora de casa.

São produtos que têm a casca removida, são cortados, ralados e submetidos a técnicas que os tornam prontos para o consumo. Ainda podem ser comercializados em embalagens com atmosfera modificada, diminuindo a quantidade de oxigênio em substituição por um gás inerte, aumentando a vida de prateleira por controlar as reações microbianas.



### Pesquise mais

O vídeo *Processamento mínimo de vegetais*, explica com detalhes como esses vegetais são preparados. Disponível em <<https://www.youtube.com/watch?v=3Hur2H711I8>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

Uma curiosidade no vídeo, e que talvez você não saiba, é que existem temperaturas adequadas de refrigeração para cada tipo de produto de origem vegetal, e, em valores abaixo delas, os vegetais sofrem alteração da qualidade em um processo conhecido como *chilling*. É por isso que a banana armazenada em geladeira fica com a casca escura e textura alterada, a temperatura de *chilling* desse fruto é de 12 °C.

## Processos tecnológicos e aplicação da biotecnologia - açúcares, mel e derivados

Quando pensamos nos produtos alimentícios açucarados, a sacarose (dissacarídeo de glicose e frutose) obtida da cana-de-açúcar e comercializada como açúcar cristal ou refinado caracteriza-se como um processo clássico.

A sacarose também pode ser produzida a partir de outros alimentos açucarados, como a beterraba, principalmente na Europa.

No Brasil, a cana-de-açúcar é a principal fonte de extração desse açúcar, assim como para a produção de combustível etanol, como veremos logo mais.

A parte da cana que fica sobre o solo é dividida em colmos, de onde se extrai o caldo concentrado em sacarose a partir de moagem.

Esse caldo passa por tratamento químico, que consiste na adição de SO<sub>2</sub>, para auxiliar na coagulação das matérias coloidais, e é caledado

com leite de cal também com esse objetivo, e precipitar impurezas e elevar o pH para valores neutros; é filtrado para remoção das impurezas coaguladas na etapa anterior e passa a ser classificado como um caldo clarificado; é, então, evaporado para a concentração do açúcar pela redução de 85 a 40% da umidade, formando um xarope grosso e amarelo; o cozimento é feito em cristalizadores que nada mais são que evaporadores de simples efeito, que acontece sob vácuo até atingir o estado de supersaturação 1, estado que permite a formação dos cristais de açúcar; a centrifugação é responsável pela separação dos cristais formados, que são secos em secadores até que a umidade seja reduzida a níveis entre 0,1 e 0,2%, garantindo a estabilidade e qualidade do produto durante o armazenamento.



### Assimile

"Supersaturação é expressa pela relação entre a quantidade de sólidos dissolvidos por unidade de água contida na solução supersaturada e a que se continha na solução saturada de mesma pureza e temperatura" (MACHADO, 2012).

Além da sacarose, o mel é um produto açucarado natural produzido pelas abelhas, apresentando em sua composição química aproximadamente 82% de açúcares entre frutose, glicose, maltose e sacarose.

É depositado em favos pela secreção de abelhas melíferas que fazem a conversão enzimática da seiva de plantas, é extraído dos favos normalmente por processos de centrifugação e apresenta uma grande variedade de derivados.



### Exemplificando

Pólen, própolis, cera, apitoxina e geleia real são exemplos de derivados do mel. Nem sempre são obtidos a partir da manipulação do produto mel como conhecemos, mas das colmeias e do processo de produção desse alimento. A geleia real, por exemplo, é obtida a partir de colmeias órfãs, quando se retira a abelha rainha e as operárias começam a nutrir uma nova larva com geleia real para formar a nova rainha.

## Agroenergia, biocombustíveis, etanol e outros combustíveis

Como comentamos anteriormente, a industrialização da cana-de-açúcar origina, além de açúcar, o combustível etanol.

Hoje a produção de combustíveis a partir de fontes renováveis, como a cana, é de grande importância sob o ponto de vista ambiental.



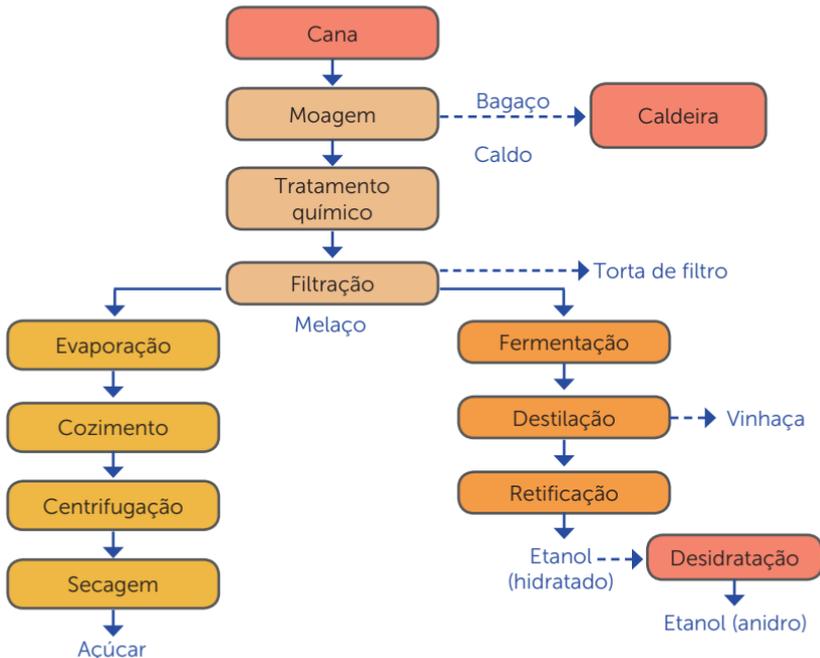
### Refleta

Pensando na questão ambiental, com relação ao uso dos combustíveis, temos a gasolina, que utiliza petróleo como matéria-prima e gera como produtos da combustão:  $9\text{H}_2\text{O}$ ,  $8\text{CO}_2$ ,  $47\text{N}_2$ ; e o etanol, que usa a cana-de-açúcar e gera como produtos:  $3\text{H}_2\text{O}$ ,  $3\text{CO}_2$ ,  $11,3\text{N}_2$ .

Qual combustível você passaria a usar a partir de agora e por quê?

A Figura 2.9 apresenta as etapas de produção de açúcar que comentamos e as etapas de obtenção do etanol a partir da cana-de-açúcar.

Figura 2.9 | Fluxograma da produção de açúcar e etanol da cana



Fonte: <[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/97/Fluxograma\\_etanol.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/97/Fluxograma_etanol.png)>. Acesso em: 29 out. 2017.

Para a produção de etanol, o caldo açucarado também passa por tratamento químico e filtração para a remoção de impurezas e obtenção de um produto mais puro em açúcares. A fermentação acontece pela ação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, com formação de até 10% de álcool, que, após a recuperação das leveduras, é destilado uma ou mais vezes (retificação) para a concentração e separação do caldo fermentado, na qual se obtém o álcool hidratado, com aproximadamente 5% de água. Opcionalmente, ele pode ser submetido a um processo de desidratação, com remoção de grande parte da água por destilação fracionada, originando o álcool anidro, com 99,6% de etanol.

O bagaço e a palha provenientes do processamento de açúcar e álcool poderiam ser caracterizados como resíduos para a indústria, porém, são utilizados na geração de energia elétrica para a própria usina e até regiões vizinhas.



**Pesquise mais**

Entenda melhor como as usinas conseguem produzir energia elétrica a partir de subprodutos da produção de açúcar em álcool consultando o artigo *Maximização da geração elétrica a partir do bagaço e palha em usina de açúcar e álcool*, de Jair Arone Maués. Disponível em: <[http://www.brasilengenharia.com/portal/images/stories/revistas/edicao583/Artigo\\_etanol\\_583.pdf](http://www.brasilengenharia.com/portal/images/stories/revistas/edicao583/Artigo_etanol_583.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2017.

## Sem medo de errar

Juntos estudamos o processamento de leite, carnes e pescados, frutas e hortaliças, açúcares, mel e até a geração de energia a partir de subprodutos da indústria; agora estamos aptos a ajudar Francisco a otimizar o aproveitamento de todas as matérias-primas que tem em seu sítio.

Vimos que a partir do leite que ele ordenha de vacas, pode produzir, facilmente, queijo e iogurte. Sem precisar de equipamentos especializados, a partir de utensílios que tem em casa, ele faz a coagulação do leite por adição de enzimas, ácidos, ou microrganismos, e produz queijo. O iogurte pode ser feito a partir de um copo de iogurte tradicional adquirido comercialmente, simples assim.

Com carne suína e toucinho, vimos que ele pode produzir salame, e ainda embutir no próprio intestino do animal, após limpeza e higienização, claro. Como fez com o pepino na produção de pickles, pode ainda processar o repolho e obter chucrute, além de outros vegetais em conserva. Utilizando a uva, que ele também cultiva em suas terras, pode produzir suco, polpa e até vinho! Das colmeias de abelhas pode extrair o mel, a cera que cobre os opérculos (orifícios do favo), o pólen, que fica retido nas grades e a própolis, utilizada para cobrir superfícies irregulares da colmeia.

E, se ainda pensarmos que a produção de suco, polpa ou vinho de uva gera resíduos que poderiam ser um problema ambiental, essas cascas e sementes de uva podem ser secas ao sol, para então serem queimadas e funcionar como combustível na produção de vapor, que pode ser aplicado em muitos desses processos que estudamos, como no aquecimento do leite durante a produção de queijo. Assim, Francisco resolve o problema de reduzir a quantidade de resíduos gerados e ainda os aproveita como fonte de energia nos processos de industrialização dos alimentos, conseguindo maior economia.

Como você vai montar uma cartilha e palestrar para Francisco e outros agricultores sobre o processamento dessas matérias-primas, não esqueça de tudo que aprendemos até aqui.

As matérias-primas devem ser higienizadas, armazenadas da melhor forma possível. Todos os parâmetros de processo devem ser controlados para que os resultados sejam os esperados e padronizados. Diferentes produtos também são submetidos a diferentes técnicas de conservação, embalagem, armazenamento e distribuição, dependendo de suas características.

Faça isso em um fluxograma, apresente fotos dos equipamentos, torne o ensino e o aprendizado muito mais fáceis e, dessa forma, Francisco não se somará mais às estatísticas de desperdício do nosso país.

## Avançando na prática

### Contaminação de salame

#### Descrição da situação-problema

O gerente de um pequeno frigorífico decide introduzir o salame na linha de produtos da indústria. Afinal, ele tem todas as matérias-primas

necessárias à produção desse embutido ali mesmo. Então, ele faz o primeiro teste. Pesa e mistura os ingredientes de qualidade: carne suína, toucinho, nitrito de sódio, sal, condimentos, ácido ascórbico e embute em tripa bovina. Não adiciona cultura *starter* porque acredita que os microrganismos que naturalmente contaminam a carne e os demais ingredientes realizarão a fermentação láctica. Depois de uma semana em uma sala do frigorífico, que ele destinou ao armazenamento dos produtos, percebe o desenvolvimento de um odor desagradável de enxofre e fungos pretos na superfície da tripa. O que pode ter acontecido no desenrolar do processo, causando essa contaminação indesejável dos salames?

### Resolução da situação-problema

Nós já sabemos que a fermentação natural do produto pode acontecer, mas a adição da cultura *starter* já inicia o processo com uma concentração alta de microrganismos benéficos desejáveis, que irão competir com os microrganismos deteriorantes presentes na matéria-prima. Além disso, não é qualquer sala do frigorífico que o gerente pode disponibilizar para o período de fermentação e maturação do produto, deve existir controle de temperatura e umidade. A junção desses erros provavelmente ocasionou a contaminação indesejada dos salames, tornando-os inaptos e inseguros ao consumo. Outro teste deve ser realizado corrigindo essas não conformidades.

### Faça valer a pena

**1.** A produção de queijos consiste em coagular a proteína do leite, caseína, separando-a do restante do leite, produto que passa a se chamar soro, misturando a essa massa ingredientes característicos de cada tipo de queijo e dando forma ao produto, que pode ser comercializado fresco ou maturado por diferentes períodos de tempo.

Existem diferentes formas de realizar a coagulação da caseína para a produção de queijos. Assinale a alternativa que apresenta uma opção correta para esse processo.

- a) Adição de ácido nítrico.
- b) Aquecimento até a temperatura de 100 °C.
- c) Uso da enzima pepsina.
- d) Aplicação de leveduras do gênero *Saccharomyces*.
- e) Adição de ácido láctico.

**2.** A produção de salame, um embutido cárneo, agrega valor à matéria-prima e confere sabor e odor agradáveis e característicos ao produto final, apresentando grande aprovação e preferência por parte dos consumidores. Porém, é um produto que exige muito controle de diversas variáveis do processo, por ser fermentado e não poder apresentar, em hipótese alguma, contaminação microbiana indesejável.

Sobre o processo de fermentação que dá origem ao salame, assinale a alternativa que apresenta parâmetros que devem ser controlados para obtenção de produto de qualidade e seguro.

- a) Espécie de origem da carne utilizada: suína ou bovina.
- b) Carga e tipo de microrganismos que contaminam a matéria-prima.
- c) Tipo de envoltório utilizado no embutimento: tripa de colágeno ou celulósica.
- d) Quantidade de peças mantidas em processo de fermentação.
- e) Material da embalagem secundária.

**3.** O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e extrai desse vegetal a sacarose, dissacarídeo de frutose e glicose comercializado como açúcar.

Assinale a alternativa que apresenta a sequência correta das etapas utilizadas na obtenção do açúcar da cana.

- a) Colheita, moagem, tratamento químico, filtração, evaporação, cozimento, centrifugação e secagem.
- b) Colheita, moagem, tratamento químico, evaporação, cozimento, filtração, centrifugação e secagem.
- c) Moagem, tratamento químico, evaporação, cozimento, filtração e centrifugação.
- d) Colheita, descascamento, centrifugação, evaporação, secagem.
- e) Colheita, descascamento, prensagem, tratamento químico, evaporação, cozimento e secagem.

# Referências

- ALIMENTOS PROCESSADOS. **Origem e evolução tecnológica de alimentos.** Disponível em: <<http://www.alimentosprocessados.com.br/ciencia-tecnologia-origem-e-evolucao-da-tecnologia-de-alimentos.php>>. Acesso em: 18 out. 2017.
- De ALMEIDA, C. P. et al. Biotecnologia na produção de alimentos. Dossiê técnico, **USP inovação.** 2011.
- DENDER, A. G. F. V. ZACARCHENO, P. B.; ALVES, A. T. S. **Requeijão:** tecnologias de fabricação da massa básica. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/queijos/requeijao-tecnologias-de-fabricacao-da-massa-basica-parte-1-91254n.aspx>>. Acesso em: 5 dez. 2017.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos.** 2. ed. S.l.: Atheneu, 2008. p. 3-35.
- EVOLUCIONAL. **Fermentação alcoólica.** Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=DF2AAWv-zXU>>. Acesso em: 17 out. 2017.
- FOLHA de São Paulo. **Brasil lidera avanço global de transgênico.** Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2017/05/1884344-brasil-lidera-avanco-global-de-transgenicos.shtml>>. Acesso em: 21 out. 2017.
- GAVA, A. J. DA SILVA, C. A. FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos:** princípios e aplicações. 4. ed. S.l.: Nobel, 2009. p. 61-63.
- G1. **Conheça o processo de classificação e beneficiamento dos grãos de café.** Disponível em: <<http://g1.globo.com/bahia/bahia-rural/videos/v/conheca-o-processo-de-classificacao-e-beneficiamento-dos-graos-de-cafe/3643058/>>. Acesso em: 2 nov. 2017.
- LIMA, U. A.; et al. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Edgard Blücher LTDA, 3. ed. 2001.
- MACHADO, S. S. **Tecnologia da fabricação do açúcar.** E Tec. rede Brasil. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Campus Goiás. 2012. Disponível em: <[http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico\\_acucar\\_alcool/tecnologia\\_fabricacao\\_acucar.pdf](http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/tecnologia_fabricacao_acucar.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2017.
- KEFIR de leite. Disponível em: <<http://probioticosbrasil.com.br/index.php/probioticos/kefir-de-leite>>. Acesso em: 5 dez. 2017.
- RAMOS, E. M.; FONTES, P. R. GOMIDE, L. A. M. RAMOS, A. L. S. **Ciência, obtenção e tecnologia da carne.** 1. ed. Lavras: Editora UFLA/FAEPE, v. 1. p. 202. 2011.
- SALON EMPREENDEDOR. **Passo a passo, como fabricar polpa de frutas.** Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=Jm4IWleM344>>. Acesso em: 8 out. de 2017.



# Biotecnologia na indústria farmacêutica de medicamentos

### Convite ao estudo

Olá, aluno!

Bem-vindo à unidade de ensino em que vamos aprender a aplicar as biotecnologias na produção de medicamentos.

A partir da manipulação de organismos vivos, identificação e separação de substâncias produzidas por eles, muitas delas, de acordo com pesquisas, têm demonstrado potencial terapêutico.

Esses novos medicamentos, também chamados de biofármacos, se apresentam como parcela crescente na produção de remédios e são boa opção para o tratamento de doenças crônicas e complexas, mas quando se trabalha com organismos vivos, material genético e substâncias produzidas por eles, é preciso ter todos os cuidados necessários.

Mesmo com todas as dificuldades, não só tecnológicas, mas também legais, podemos esperar sim que seja a nova tendência da indústria farmacêutica aplicar no organismo humano substâncias produzidas por outros organismos vivos.

Por isso, não perca a oportunidade de aprender sobre esses medicamentos do presente e do futuro, o que são, como são produzidos a partir de manipulação de organismos vivos, como são extraídos, isolados e purificados, como e em quais moléculas agem, suas características e os diferentes tipos que a biotecnologia já produziu sendo aplicados nos mais diversos tipos de tratamentos terapêuticos.

# Seção 3.1

## Fundamentos biotecnológicos aplicados aos fármacos

### Diálogo aberto

Um grande laboratório farmacêutico decide entrar no promissor mercado de biofármacos. Denise, recém-formada em farmácia e bioquímica e contratada do laboratório, foi escalada para essa nova linha de produção. Porém, com pouco tempo de experiência, ela precisa revisar os livros para relembrar as técnicas e conhecimentos aplicados nesse tipo de industrialização.

Inicialmente, Denise procura entender o que são os biofármacos. Seus estudos se iniciam com a produção de macromoléculas, especialmente as enzimas que têm potencial terapêutico. A primeira produção de enzimas não saiu como esperado, a quantidade obtida era muito menor em relação a que os protocolos de produção indicavam. O que pode ter acontecido e originado esse problema?

### Não pode faltar

#### Introdução a aplicação de biotecnologia em desenvolvimento de fármacos

O uso de organismos vivos na produção de medicamentos dá origem aos chamados biofármacos.

Como vimos em nossa primeira unidade de ensino, a produção de penicilina, um antibiótico de origem fúngica, marca o início do desenvolvimento desse tipo de medicamento.

Esses produtos vêm aumentando consideravelmente em quantidade e tipo nos últimos anos e, desde o ano de 2003, já representavam quase 50% da produção entre remédios para tratamento de câncer (154 unidades), doenças infecciosas (43 unidades), doenças autoimunes (26 unidades) e AIDS (17 unidades). Mais de um quinto dos medicamentos lançados a cada ano são derivados de biotecnologia.

A produção desses medicamentos é bem mais complexa que das drogas sintéticas devido à composição heterogênea dos

componentes ativos dos organismos, capazes de interagir com as proteínas do corpo humano.



Refleta

Vamos pensar na criação de um organismo transgênico que passará a produzir determinada proteína aplicada como biofármaco. Quantas informações desconhecidas esse gene pode carregar? Ou ainda, quantas informações armazenadas e de controle de expressão podem estar presentes em regiões não codificadoras? Imagine tudo isso interagindo em um organismo complexo como o humano. Realmente, não parece ser fácil de controlar.

Mesmo com essa dificuldade, os investimentos em pesquisa vêm aumentando na tentativa de encontrar terapias mais eficientes no tratamento de doenças crônicas e complexas, e entre aquelas malsucedidas, muitas têm apresentado resultados satisfatórios, que vão além da descoberta de novos tratamentos, permitindo também à indústria farmacêutica produzir os medicamentos em grande quantidade atendendo a toda população que dele necessita.

A biotecnologia no desenvolvimento de medicamentos apresenta inúmeras vantagens como: produção de medicamentos mais eficazes e específicos com menos efeitos colaterais, menores riscos de contaminação por agentes infecciosos e produção em larga escala de substâncias existentes, como a insulina para o tratamento de diabetes.

A biotecnologia vem sendo aplicada no desenvolvimento recente de medicamentos personalizados, que levam em conta a genética de cada indivíduo, apresentando resultados muito mais eficazes devido às dosagens exatas e controle dos genes sobre as proteínas do corpo humano.

No cenário da corrida biotecnológica da indústria farmacêutica, nosso país se depara com grande barreira tecnológica por não dominar a fabricação de todos os princípios ativos utilizados nesses medicamentos, o que gera uma despesa de aproximadamente 4 bilhões de dólares com importação.

Você, como futuro farmacêutico, pode fazer parte deste setor, trabalhar em pesquisas que tragam esses avanços necessários ao nosso país e fazer a diferença!

## **Introdução à aplicação de medicamentos macromoleculares**

Na produção industrial de proteínas e enzimas, macromoléculas formadas por unidades básicas de aminoácidos, dependendo de suas funções e especificidades, podem ser aplicadas como medicamentos no tratamento de doenças.

As enzimas são proteínas que contêm sítio catalítico específico (local onde acontece a reação química) e, por isso, são agentes de grande potencial para uso terapêutico.

Por gerarem produtos a partir de substratos, promovem transformações bioquímicas no organismo humano, essas transformações podem ser aplicadas no tratamento de doenças.

### **Enzimas de interesse farmacêutico: pesquisa e desenvolvimento de insumos e medicamentos**

Com essa finalidade, de ser utilizada como medicamento, a enzima deve apresentar as seguintes características:

1. Baixa resposta imunológica, preferencialmente provenientes de organismos não patogênicos.
2. Alta atividade e estabilidade em pH fisiológico.
3. Alta afinidade pelo substrato.
4. Não ter necessidade de cofatores exógenos, o que aumentaria a necessidade de mais compostos no medicamento.
5. Pouca inibição por componentes dos fluidos corporais.
6. Efetiva irreversibilidade da reação enzimática sob condições fisiológicas.

Agora, imagine a dificuldade de encontrar enzimas que cumpram a todos esses requisitos citados. Isso torna as pesquisas em busca dessas macromoléculas mais difíceis.

No entanto, a necessidade de desenvolvimento de tratamentos mais eficientes incentiva a fazer pesquisas que têm descoberto enzimas eficazes aplicadas no tratamento de doenças.

A trombose é uma doença do sistema vascular originada por um coágulo sanguíneo em uma veia e é uma das principais causas de morte no mundo. Até algum tempo atrás, não existia tratamento para a doença, e o paciente com trombose deveria permanecer em repouso, usar meias de compressão e esperar que o próprio organismo absorvesse o coágulo. Dependendo da resposta do

corpo, alguns se viam livres do coágulo enquanto outros não, continuando com a obstrução nas veias.

Hoje, o uso das enzimas estreptoquinase e uroquinase, aplicadas por via intravenosa, inicia o processo de dissolução do coágulo aumentando as chances de sucesso na desobstrução do fluxo sanguíneo.

Outras enzimas já foram isoladas e testadas no tratamento de doenças e passaram a compor medicamentos, como você pode ver nos exemplos.



### Exemplificando

Enzimas isoladas e testadas no tratamento de doenças:

- a. Amilases e asparaginase, provenientes de pâncreas bovino e suíno ou fungos. São aplicadas como auxiliar digestivo e no tratamento da leucemia.
- b. Bromelina e celulase do abacaxi e fungos, respectivamente, são utilizadas no debridamento (remoção de tecidos sem vida) de feridas.
- c. Pancreatina, também do pâncreas bovino e suíno, é usada no tratamento de insuficiência pancreática.
- d. Papaína, do mamão, e lisozima, da clara do ovo, são medicamentos do tratamento da hérnia de disco e infecções.



### Pesquise mais

Consulte o link disponível em: <<http://www.canal.fiocruz.br/destaque/index.php?id=1430>>, acesso em: 31 jan. 2018, que apresenta reportagem sobre a liberação da produção da L-asparaginase como medicamento no tratamento da leucemia infantil. Essa enzima degrada o aminoácido L-asparagina encontrado no plasma que é essencial à sobrevivência das células tumorais.

## Principais microrganismos utilizados na produção de compostos biológicos

De acordo com Dellweg (1983), (apud LIMA, et al., 2001), a aplicação industrial está no cerne da biotecnologia, ao se utilizar organismos unicelulares para converter produtos e criar materiais.

Assim, os microrganismos usados variam em função, principalmente, do objetivo, e do tipo de produto que se deseja obter.

Já vimos as aplicações das células microbianas na tecnologia de alimentos, assim como no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados e transgênicos. Mas, mesmo aqui no âmbito das aplicações farmacêuticas, os microrganismos apresentam potencial de aplicação. De forma geral, a maioria dessas macromoléculas aplicadas como medicamentos tem sua origem microbiana.

Na indústria farmacêutica, o uso de microrganismos na obtenção de compostos de interesse começou com a descoberta de Alexander Fleming, em 1929, que percebeu que produtos do metabolismo secundário do fungo *Penicillium* inibiam o crescimento de colônias de estafilococos.

Hoje, o antibiótico é comercializado como penicilina, com eficiência testada e comprovada.



### Pesquise mais

O artigo *Alexander Fleming e a descoberta da penicilina* mostra como foi conduzida a experiência de Alexander Fleming durante a descoberta da penicilina e como poderia ser reproduzida empiricamente.

Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442009000500001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442009000500001)>. Acesso em: 31 jan. 2018.

Outras substâncias com atividade antibiótica foram descobertas e contamos com um total de 8.000 que podem ser utilizadas nos medicamentos destinados ao tratamento de infecções.

São produzidos por bactérias, actinomicetos e fungos distribuídos de acordo com a quadro a seguir.

Quadro 3.1 | Número de antibióticos produzidos pelos principais grupos de microrganismos

Grupo taxonômico	Número de antibióticos
Bactérias diferentes de actinomicetos	950
Actinomicetos	4.600
Fungos	1.600

Fonte: Lima et al. (2001).

Entre os fungos, os antibióticos produzidos por *Aspergillaceae* e *Moniliales* têm importância prática. As penicilinas cefalosporina C, griseofulvina e ácido fusídico são as que têm importância clínica.

A maior quantidade e variedade de antibióticos é encontrada nos actinomicetos, especialmente no gênero *Streptomyces*. No entanto, não são apenas as substâncias antibióticas que são obtidas pela ação da biotecnologia sobre os microrganismos.



### Exemplificando

A produção dos hormônios adrenocorticóides, corticosterona, cortisona e hidrocortisona baseia-se na biotransformação de esteroides pela adição de um oxigênio no carbono 11 da molécula, realizada por microrganismos.

As vacinas também são produzidas a partir de microrganismos. Consistem em injetar no organismo humano o microrganismo responsável pela doença inativo ou atenuado, para iniciar o processo de resposta imune. Assim, a vacina para cólera utiliza como microrganismo o *Vibrio cholerae*, a da rubéola usa o *Rubivirus Togaviridae*, os próprios causadores da doença, que não serão responsáveis pelo desenvolvimento das mesmas por estarem na forma inativa ou atenuada, mas possibilitarão uma resposta imune do organismo humano, com produção de anticorpos específicos para eles.

### Enzimas: catálise enzimática, tipos de enzimas e importância

Já vimos que as enzimas apresentam aplicações tanto na indústria de alimentos como na farmacêutica, isso devido a sua atividade catalítica.

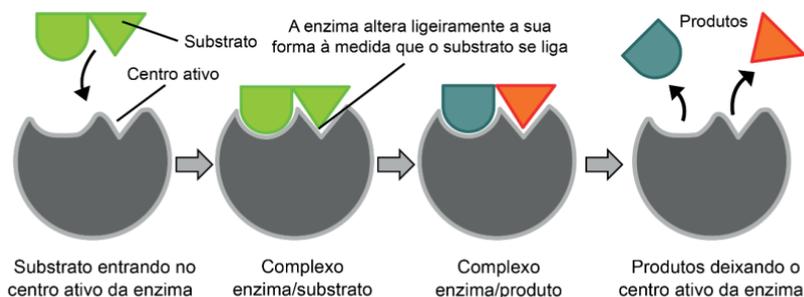
A enzima é uma proteína que acelera ou inibe uma reação química, atuando como um catalisador, só que biológico. Apresenta uma forma única que determina sua função e substrato em que atua, sendo este específico.

A importância da aplicação dessas proteínas está justamente no fato de promoverem ou inibirem o desenvolvimento de reações, mas, para isso, precisam ser cumpridas algumas exigências.

Como proteínas, as enzimas apresentam atividade ótima em determinados valores de temperatura e pH. Valores extremos desses parâmetros desnaturam a enzima e esse processo pode ser irreversível.

A Figura 3.1 mostra um esquema de ação enzimática, com a ligação do sítio ativo dessa proteína ao substrato a ser transformado e posterior liberação do produto.

Figura 3.1 | Diagrama do modelo do encaixe induzido em enzimas



Fonte: adaptada de <[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Induced\\_fit\\_diagram\\_pt.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Induced_fit_diagram_pt.svg)>. Acesso em: 31 jan. 2018.

Este exemplo poderia ser uma reação de lise, ou quebra de alguma molécula em diferentes produtos, ou ainda a enzima com aplicação medicamentosa que vimos no exemplo da trombose que, quando aplicada, dissolve ou quebra os coágulos, desobstruindo as veias.

As enzimas com essas aplicações mais diversas podem ser obtidas de diferentes fontes, sendo de origem microbiana, vegetal ou animal.



### Exemplificando

As principais enzimas de origem vegetal são papaína, extraída do mamão e a bromelina, de origem do abacaxi, que são aplicadas no amaciamento de carne. A ficina é extraída de figueiras e age sobre anticorpos produzidos por cavalos imunizados com veneno de cobra, para a produção de soros, como o antiofídico. As de origem animal são a pancreatina, que é utilizada no tratamento de insuficiência pancreática, a pepsina, enzima digestiva que atua na quebra de proteínas, a renina de origem fúngica ou de estômago de bezerros lactentes, aplicada na produção de queijos e a catalase, proveniente do fígado, decompõe peróxido de hidrogênio. Também, a maioria delas pode ser obtida de origem microbiana, como já vimos.

## Reação com enzimas - velocidade e fatores que interferem a velocidade das reações

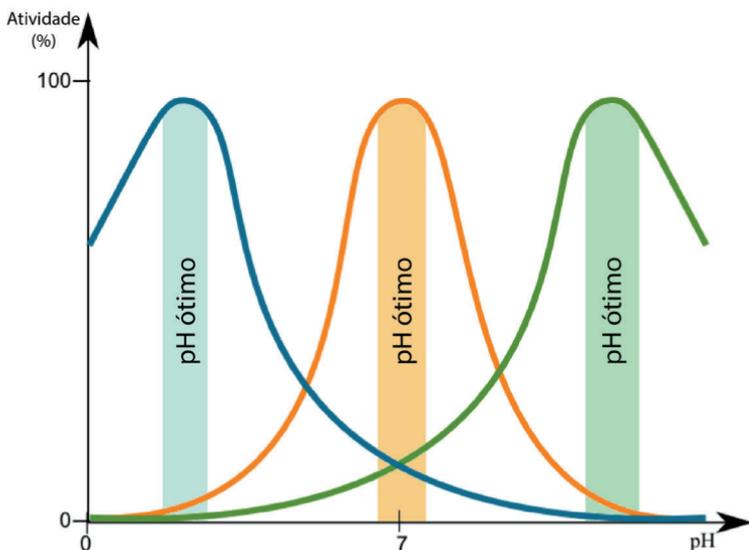
Já comentamos que as enzimas, como proteínas, são influenciadas por diversos fatores e podem ter sua atividade otimizada ou controlada com a variação de deles.

Falamos da temperatura e do pH. Cada enzima apresenta um valor ótimo dessas medidas para sua atividade máxima e, em valores extremos, além de se tornar inativa, pode ainda ser desnaturada (perda da estrutura ativa terciária).

Sob essas condições em que a atividade enzimática é máxima, a velocidade também é maior. Isso quer dizer que a velocidade de transformação do substrato em produto é maior. O que pode ser interessante, não acha? Se você adiciona uma enzima a um processo, é justamente o que deseja: acelerá-lo e obter produtos mais rapidamente. Então, procure sempre trabalhar sob condições ideais para as enzimas.

Com relação ao pH, a figura a seguir apresenta curvas de atividade de três enzimas (cada uma representada por uma cor) em função do valor de pH.

Figura 3.2 | Representação esquemática da influência do pH na velocidade de formação do produto (atividade da enzima)



Fonte: adaptada de <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Enzyme-ph-es.png>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

Consegue perceber que para cada uma das curvas, que representam enzimas diferentes, há um ponto máximo de atividade? Ponto esse em que a velocidade de transformação de substrato em produto também é máxima, pois é favorecido por determinados valores de pH específicos para cada enzima.

A curva de temperatura apresenta comportamento semelhante à do pH.

Além desses fatores, a concentração enzima/substrato também influencia a velocidade das reações enzimáticas.

Para entendermos como isso funciona, vamos voltar no caso da trombose, no qual usaríamos a enzima uroquinase para dissolver os coágulos. O que aconteceria se usássemos pouca enzima para a quantidade de coágulo existente? E o contrário, muita enzima para pouco sangue coagulado?

Bom, no primeiro caso, chegaria um momento em que todas as enzimas estariam ligadas/saturadas com substrato, não estando disponíveis para agir sobre outras moléculas. Com isso, a velocidade atingiria um limite e se manteria praticamente constante nesse valor devido à limitação de enzima. No caso de uso de muita enzima para pouco substrato, a velocidade aumentaria como uma reta crescente, sendo proporcional à concentração de enzima até que atingisse o limite de substrato, ou seja, enquanto existir substrato, existirá a enzima transformando-o em produto e isso garante ao sistema atividades máximas.



### Assimile

O modelo de Michaelis e Menten é um dos mais aceitos para explicar a influência das concentrações iniciais de enzima e substrato, assumindo as seguintes hipóteses mais simples:

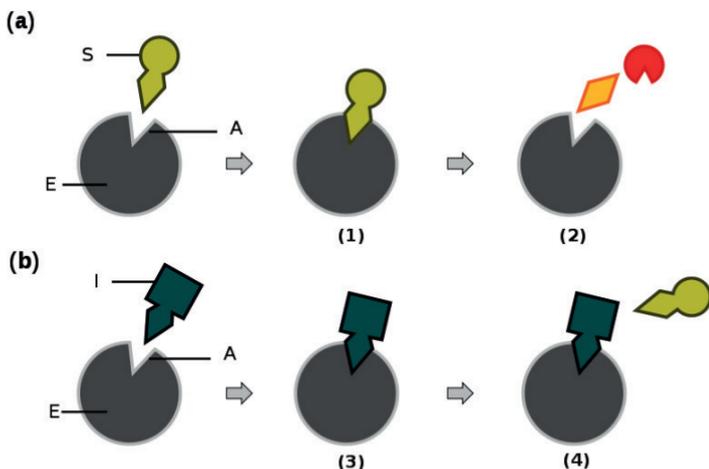
- a. A formação do complexo enzima-substrato se dá na proporção de 1 mol de substrato para 1 mol de enzima, produzindo 1 mol do complexo.
- b. O complexo formado se decompõe, sem reagir com outras substâncias do sistema.

Para cada etapa da reação enzimática, formação do complexo, dissociação e decomposição formando o produto, existe uma constante que pode ser associada à velocidade da reação.

Por fim, a presença de inibidores também influencia a velocidade das reações enzimáticas, pois se ligam às enzimas tornando-as indisponíveis para formar o complexo enzima-substrato.

Veja como atua o inibidor no esquema apresentado na Figura 3.3.

Figura 3.3 | Ligações formadas com enzimas, (a) formação do complexo enzima-substrato com obtenção do produto; (b) ligação do inibidor à enzima impedindo a formação do complexo com o substrato



Fonte: <[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/03/Competitive\\_inhibition\\_int.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/03/Competitive_inhibition_int.svg)>. Acesso em: 31 jan. 2018.



**Pesquise mais**

Conheça os tipos de inibidores enzimáticos e como eles atuam consultando as páginas 147 a 150 do livro *Bioquímica: estudo e ensino* (CAMPBELL e FARELL, 2015) disponível em sua biblioteca virtual.

Um exemplo de inibidor enzimático é o princípio ativo do medicamento Sildenafil, popularmente conhecido como Viagra, que inibe a enzima PDE5 responsável pelo retorno venoso dos corpos cavernosos, resultando em um influxo maior de sangue e na ereção.

## Sem medo de errar

Concluído o estudo desta seção, sabemos que algumas proteínas especializadas na função catalítica, também denominadas enzimas, atuam em sistemas biológicos permitindo ou inibindo reações bioquímicas.

Sob condições ideais, elas se ligam à substratos específicos e promovem sua transformação em produtos diferentes.

Essa função é aplicada ao tratamento de doenças a partir da transformação de algo que é maléfico ao organismo em produtos que não são e, por isso, algumas enzimas apresentam potencial terapêutico.

Elas são obtidas a partir de sistemas biológicos vivos, produzidas naturalmente por determinados organismos ou a partir de manipulação que induz sua produção. Porém, não são nada mais do que produtos da expressão gênica.

As células que produzem as enzimas podem ser um organismo unicelular, como uma levedura, mas para a otimização da produção são necessárias condições ideais para seu desenvolvimento e metabolismo.

O que poderia acontecer na produção enzimática de Denise foi o fato de não ter fornecido essas condições ideais durante o desenvolvimento das células e consequente produção das suas proteínas, que, por sua vez, foram obtidas em quantidade inferior à esperada.

A temperatura é um fator importante no desenvolvimento microbiano, assim como o meio que ele utiliza para o seu desenvolvimento, que deve fornecer os nutrientes certos e nas proporções corretas para chegar nos objetivos.

Conferindo esses parâmetros de processo e ajustando da forma adequada, Denise poderá melhorar o rendimento da produção de enzimas conforme esperado.

## Avançando na prática

### Intolerância à lactose

#### Descrição da situação-problema

Aline tem 30 anos e passou boa parte de sua vida sem poder consumir produtos à base de leite, pois apresenta intolerância ao

açúcar desta matéria-prima, a lactose. Todas as vezes que insistiu em consumir produto que apresentava leite como ingrediente, sofria com os sintomas de diarreia. Agora, passou a ingerir a enzima lactase (200mg) uma hora antes de consumir produtos de leite e seu problema foi resolvido. Como você, farmacêutico, explicaria a Aline a eficiência do medicamento?

### Resolução da situação-problema

A intolerância à lactose é uma doença genética de nascença ou adquirida em que o organismo da pessoa não é capaz de produzir a enzima lactase, responsável por quebrar o dissacarídeo lactose em glicose e galactose. Como o organismo não consegue digerir o açúcar, ele é identificado como substância estranha e a diarreia atua como defesa para eliminar essa substância do corpo.

Ao ingerir a enzima que falta em seu organismo, Aline promove a transformação do açúcar nos seus monossacarídeos e deixa de sofrer com os problemas da intolerância.

### Faça valer a pena

**1.** As enzimas, quando macromoléculas constituídas por aminoácidos, são todas proteínas, mas nem toda proteína é enzima. Isso porque as enzimas apresentam funções específicas de catalisadoras nos sistemas biológicos.

Sobre as funções das enzimas, assinale a alternativa correta:

- a) Apresentam função estrutural compondo tecidos e órgãos.
- b) Todas as células de defesa do organismo humano são enzimas.
- c) Atuam como catalisadores biológicos, promovendo reações químicas.
- d) O sítio catalítico de uma enzima normalmente tem afinidade por diferentes tipos de substratos.
- e) Enzimas não atuam sobre proteínas porque têm a mesma origem molecular.

**2.** As enzimas, como proteínas, têm sua atividade, ou velocidade de ação, influenciada por diversos fatores. Dependendo das condições, apresentam atividade máxima ou podem até ser desnaturadas, perdendo sua função.

Tendo conhecimento que os valores de temperatura, pH, concentração substrato/enzima e presença de inibidores influenciam sobre a atividade enzimática, marque a opção que explica de forma correta a ação desses fatores.

- a) A maior concentração de substrato sempre aumenta a velocidade de formação do produto.
- b) Em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), todas as enzimas apresentam atividade máxima.
- c) Os inibidores enzimáticos são universais, ou seja, quando presentes, inibem qualquer enzima.
- d) Cada enzima apresenta valor específico de pH no qual sua atividade é otimizada. Em valores extremos, ela pode ser desnaturada.
- e) Uma quantidade fixa de enzima sempre promoverá a máxima transformação de substrato em produto.

**3.** As enzimas fazem parte da classe de medicamentos macromoleculares, sendo também chamados de biofármacos por terem sua origem biológica. Têm gerado grande interesse para aplicação na indústria farmacêutica pelo potencial de transformar substâncias do organismo em substâncias que não são nocivas.

Abaixo são apresentados alguns exemplos de enzimas utilizadas pela indústria farmacêutica com potencial terapêutico. Marque a alternativa que apresenta uma aplicação correta.

- a) A uroquinase é utilizada no tratamento de trombose por promover a dissociação dos coágulos sanguíneos.
- b) A lactase promove a digestão da celulose permitindo a absorção dessa fibra pelo organismo humano.
- c) A catalase apresenta como produto de sua transformação o peróxido de hidrogênio.
- d) A enzima PDE5 é o princípio ativo do medicamento viagra e atua diminuindo a pressão arterial.
- e) A enzima pepsina realiza a lise de proteínas e lipídios.

## Seção 3.2

### A produção de biofármacos

#### Diálogo aberto

Tendo seus conhecimentos atualizados, Denise é informada de que o primeiro biofármaco a ser produzido tem como princípio ativo a enzima L-asparaginase, utilizada no tratamento de leucemia linfóide aguda. Ela se depara novamente com dificuldades, pois os primeiros lotes que produz estão contaminados com outras proteínas, o que compromete a qualidade do biofármaco que deve apresentar alta pureza. Por qual etapa Denise deveria começar o levantamento de não conformidades para identificar a falha no processo? E, tendo conhecido o problema, como ela pode resolvê-lo para as produções seguintes?

#### Não pode faltar

##### Operações unitárias envolvidas em formulação de biofármacos

Podemos pensar na produção dos biofármacos de forma generalizada, seguindo as operações de produção, isolamento e purificação dos compostos ativos que serão aplicados como medicamentos.

Para facilitar nossa compreensão, vamos avaliar o caso de produção da enzima L-asparaginase, que apresenta potencial antileucêmico, para entendermos como cada uma dessas etapas acontece.

Essa proteína é inibidora do crescimento tumoral, pois inativa os aminoácidos asparagina e glutamina resultando na inibição da síntese proteica necessária ao ciclo celular da célula cancerosa (TAHALL et al., 1970).

Na literatura científica você pode encontrar a produção dessa proteína por diferentes organismos. Aqui, manteremos nosso foco na produção da enzima por actinobactérias do solo, microrganismos que formam ramificações e produzem uma grande variedade de proteínas/enzimas.

Esses microrganismos podem ser obtidos a partir de amostras de solo, removidas de contaminações físicas, como raízes e pedras, submetidas à secagem em temperatura de 80 °C por 24 a 48 horas.

Como no solo são encontrados diversos outros microrganismos, os de interesse para a produção da enzima são separados por determinada característica, neste caso, por quimiotaxia (atração de células em direção a um estímulo químico, por exemplo, a presença de xilose).

Então, as células de interesse separadas são submetidas a um meio de cultura que permite sua proliferação para aumentarem em quantidade (neste caso o meio é o ISP-2) e são sucessivamente reinoculadas em novos meios com o objetivo de conseguir culturas puras. Mesmo assim ainda é necessária uma triagem dos microrganismos produtores da enzima, para eliminar qualquer risco de contaminação indesejada, que é feita pela inoculação dessas mesmas culturas separadas e cultivadas no meio ISP-2, agora em meio que induz a produção da L-asparaginase, por possuir como única fonte de nitrogênio o aminoácido L-asparagina. A identificação dos microrganismos produtores da enzima de interesse é feita por apresentarem como resultado positivo a formação de halo cor de rosa ao redor das colônias.

Agora, as actinobactérias, que com certeza produzirão a enzima, são submetidas às condições de fermentação na presença de caldo ISP-2, o qual permite a multiplicação das células, e de meio que induza a produção da L-asparaginase.

Realiza-se, então, a filtração do caldo para a separação dos micélios bacterianos do extrato enzimático bruto.

O filtrado é submetido à precipitação pela adição de sulfato de amônio 60%, incubado sob condições específicas de tempo, temperatura e leve agitação. Depois, o precipitado é separado por centrifugação. Essa operação é repetida várias vezes para promover a concentração dos produtos insolubilizados, neste caso a enzima.



Quando falamos de operações unitárias, referimo-nos a cada uma das etapas sequenciais em uma linha de produção industrial – conceito criado por Arthur Little em 1915 –, etapas estas que são divididas em transferências de calor, massa e momento (quantidade de movimento). No exemplo da produção de L-asparaginase apresentado anteriormente, podemos identificar transferência de massa na etapa de secagem do solo (remoção de água) e pelas separações físicas obtidas dos processos de filtração e centrifugação. Nessas mesmas etapas, há também a transferência de calor quando a temperatura do solo é aumentada e transferência de momento quando o fluido passa pelo filtro, além de ter alteradas as suas propriedades de movimento.

### **Obtenção de enzimas como agente terapêutico**

Como já vimos, as enzimas aplicadas como princípio ativo de medicamentos podem ser de origem microbiana, vegetal ou animal. O importante é o potencial metabólico que ela apresenta, testado em reações que podem ser utilizadas como tratamentos de doenças.

Mas, antes disso, precisamos conseguir produzir a enzima.



As enzimas destinadas às aplicações terapêuticas devem apresentar alta pureza, obtendo-se quantidades relativamente pequenas com relação às obtidas pelas indústrias de alimentos e de detergentes.

A primeira etapa na obtenção de uma enzima é a extração. Se for uma enzima extracelular, deve-se tomar o cuidado de não romper as células produtoras para evitar contaminação desnecessária e inclusão de mais etapas de purificação. Mas, se for uma enzima intracelular, é necessária a lise (rompimento) celular.

No nosso estudo sobre a produção de L-asparaginase por actinobactérias, vimos que é um produto extracelular, que foi separado do extrato com células por filtração e centrifugação.

Se pensarmos na produção de lactase intracelular – a enzima que digere a lactose do leite em glicose e galactose –, poderíamos realizar a quebra de células microbianas produtoras por

congelamento e descongelamento. A formação de cristais de gelo, principalmente os grandes, formados por congelamento lento, rompem as membranas celulares.



### Pesquise mais

Existem diversas outras formas de realizar a lise celular. Fique por dentro consultando as páginas 259 a 264 do Anexo – *Estudo dos Métodos Mecânicos de Rompimento Celular* (NEVES, 2003). Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-08102006-175534/pt-br.php>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

Pensando agora em ambos os casos, tanto na L-asparaginase, produzida por fermentação, quanto na lactase, produzida em meio intracelular e agora liberada para o extrato celular, precisamos fazer a purificação da enzima, que, como vimos, deve ser elevada para as aplicações farmacêuticas.

Também existem diversas técnicas que podem ser aplicadas com esse propósito, e a escolha de cada uma delas depende do conhecimento sobre a enzima, sobre suas propriedades, para otimizar a separação dessas enzimas dos demais componentes do extrato.



### Exemplificando

Na produção de L-asparaginase, a purificação foi feita por métodos físicos, filtração e centrifugação, baseados basicamente no tamanho das moléculas. Para purificarmos lactase, poderíamos utilizar uma técnica mais específica para essa enzima, como a separação baseada na solubilidade, uma vez que a adição de sais aumenta a força iônica fazendo com que as proteínas se agreguem e precipitem.

Veremos mais técnicas em detalhes ao final desta seção.

Por fim, as enzimas devem ser concentradas, pela remoção da água, justamente com o objetivo de torná-las o mais puras possível.

Para isso, podemos escolher o processo de liofilização, que remove a água sob vácuo, por processo de sublimação de forma rápida, mantendo a atividade enzimática.

Reforçando o que aprendemos no conteúdo anterior, todas essas etapas de extração, separação e concentração, aplicam operações unitárias de transferência de calor, massa e momento.

## Obtenção de enzimas como alvo para ação de biofármacos



Refleta

Estudamos que as macromoléculas proteínas/enzimas são os principais componentes ativos dos biofármacos e já vimos como podemos produzi-las. Mas de onde vem o potencial de cada enzima para atuar no tratamento de doenças? Você já pensou em que testes poderiam ser feitos para determinar qual enzima seria mais eficiente agindo sobre determinadas moléculas? Que moléculas seriam essas?

A fim de manter nosso estudo no tratamento de células cancerígenas, acompanhe outra situação:

A galectina-3, proteína humana codificada pelo gene *LGALS3*, exerce diversas funções no organismo. Quando presente em grande quantidade na circulação, permite a identificação de pacientes predispostos a desenvolver insuficiência cardíaca. Também é percebido o aumento dessa proteína no plasma sanguíneo de pacientes metastáticos (ALISSON, 2015).

Assim, essa proteína se tornou um biomarcador para diversos estados patológicos e também alvo para a ação terapêutica.

A expressão da galectina-3 aumenta em condições de falta de oxigênio, podendo induzir a formação de vasos sanguíneos e crescimento do tumor.

Por essa e outras capacidades, a molécula tem se tornado alvo terapêutico, mesmo sendo conhecido que nem sempre o tumor depende dela para se desenvolver.

Você já conseguiu entender o que é o alvo terapêutico ou alvo para a ação dos biofármacos?

É justamente uma macromolécula que está presente e pode caracterizar determinado tipo de doença, aparecendo no organismo em decorrência dela, e por isso pode atuar como o alvo da ação dos medicamentos.

O nosso exemplo apresentou uma proteína. Já vimos que as enzimas são proteínas, então podem ser extraídas, isoladas e purificadas também com a função de serem testadas como alvo de ação dos biofármacos, e não apenas como princípio ativo deles.

Descobrir alvos de diferentes doenças é importante para a compreensão de tratamentos que não dão certo em algumas pessoas.

Essa determinação é feita pela extração de RNA de amostra do tecido ou células doentes que permitem mensurar quais genes estão mais ou menos expressos no local, chegando nas proteínas/enzimas mais transcritas e traduzidas, que podem acompanhar a doença ou sua evolução.

Quando identificado um potencial alvo de ação do fármaco, este passa por uma série de testes biológicos em nível molecular, celular e orgânico para definir a afinidade e a seletividade do futuro candidato a fármaco, trazendo as vantagens de determinar possíveis efeitos tóxicos e até revelar outras ações terapêuticas não previstas anteriormente.



**Refleta**

A proteína galectina-3, além de ser marcadora da presença de células tumorais, também é usada na identificação de pacientes predispostos à insuficiência cardíaca. Será que ela poderia ser usada como alvo para ação de biofármacos (enzimas) utilizados no tratamento desse tipo de doença? Já se imaginou fazendo testes nesse sentido e colocando uma nova opção de medicamento no mercado?

## **Alteração do código genético do microrganismo**

Os microrganismos são a principal fonte produtora de enzimas porque podem ser cultivados em grande quantidade em curto espaço de tempo, em condições mais fáceis de serem controladas e sem dependência de questões geográficas e sazonais.

A L-asparaginase, que temos estudado como composto terapêutico, é produzida por microrganismos como *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora*, apresentada com o nome comercial Erwinase.

A técnica do DNA recombinante, aprendida em nossa primeira unidade, é aplicada aos microrganismos produtores de enzima, inserindo no DNA destes o gene que codifica a proteína de interesse.

É exatamente isso o que é feito com os microrganismos que produzem a L-asparaginase.

Essa enzima é naturalmente produzida por actinobactérias do solo e pela bactéria *Zymomonas mobilis*, porém em pequena quantidade.

Por isso, a evolução na produção industrial dessa enzima foi possível pela inserção do gene que codifica a L-asparaginase oriundo da *Z. mobilis* no genoma da *E. coli* (sistema de expressão amplamente conhecido), por técnicas de DNA recombinante, permitindo maior produtividade.

O plasmídeo é inserido na célula e a formação da proteína é induzida por condições ambientais, por exemplo a adição de lactose ao meio ou seu análogo não hidrolisável isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG).



### Pesquise mais

Acesse a dissertação referenciada a seguir e veja a Figura 2.3, denominada *Mecanismo de indução por lactose ou IPTG no organismo hospedeiro*. Ela apresenta o esquema de controle da expressão do gene produtor da enzima L-asparaginase inserido na célula de *E. coli*. Os compostos indutores (lactose ou IPTG) se ligam a LacI (proteína repressora do promotor lac, região que inicia a transcrição e tradução), impedindo essa proteína de se ligar ao DNA da *E. coli*. Dessa forma, libera a região promotora para iniciar a produção da enzima.

WASHINGTON, M. P. L. **Modelagem do processo de produção da L-asparaginase recombinante utilizando a abordagem dinâmica da análise do balanço de fluxos metabólicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2016. Disponível em: <<http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/producao-academica/dissertacoes-de-mestrado/2016/437--18/file>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

## Isolamento e purificação do componente ativo

Nós já aprendemos como produzir as enzimas em maior escala, induzindo células, e também vimos que processos de isolamento e purificação são necessários para separá-las do restante do extrato formado e torná-las puras, característica muito importante na produção de componentes ativos de biofármacos.

Veremos, então, com detalhes, como essas etapas podem ser realizadas, a fim de otimizar a qualidade do produto.

É importante sempre lembrar que as enzimas são proteínas e, por isso, são necessários muitos cuidados para manter a atividade delas, ou seja, evitar a desnaturação.

Por isso, essas etapas de isolamento e purificação acontecem, na maioria das vezes, sob temperaturas de 4 °C, podendo ser adequada aos equipamentos uma câmara fria, utilizando gelo, refrigeradores e congeladores.

O uso de soluções-tampão também é essencial para regular o valor de pH, outro fator responsável pela atividade e desnaturação das proteínas.

Seguidas as condições para a manutenção da atividade da enzima, os métodos de isolamento e purificação podem ser baseados em princípios físicos ou químicos, conforme apresentado a seguir:

1. Solubilidade: depende das cargas das proteínas em um solvente aquoso sob determinadas condições. Cada proteína apresenta um valor de pH no qual suas cargas se anulam (carga positiva = carga negativa). Este valor de pH é conhecido como ponto isoelétrico, e nele as proteínas se tornam insolúveis, separando-se do restante do extrato aquoso. Como isso pode influenciar na atividade enzimática, é a técnica mais aplicada para separar proteínas contaminantes, ou seja, aquelas que não são de interesse durante o processo de produção das enzimas com potencial terapêutico.
2. Carga: o principal método que utiliza as cargas da enzima para isolamento e purificação é a cromatografia. Esta técnica consiste em utilizar uma fase estacionária e uma fase móvel, onde se encontram as substâncias a serem separadas, e se baseia no fato de diferentes compostos apresentarem diferentes afinidades pela fase móvel e pela fase estacionária. Neste caso, pode ser aplicada uma cromatografia de troca iônica, que envolve a adsorção dos grupos carregados em resina da fase estacionária, fazendo com que as enzimas (moléculas carregadas) se desloquem mais lentamente pela coluna cromatográfica, enquanto que outras moléculas deixam a coluna mais rapidamente.
3. Tamanho: a técnica baseada na separação de enzimas pelo tamanho também é aplicada à diferentes tipos de cromatografia,

denominadas filtração em gel, cromatografia de exclusão em gel e cromatografia em gel. O princípio é o mesmo, de escoar uma fase móvel, que contém o extrato, por uma fase estacionária, desta vez uma fase estacionária com porosidade definida e que permitirá a passagem das moléculas com velocidades diferentes. As moléculas menores penetram no gel e fazem todo o caminho por dentro dele, levando maior tempo para saírem da coluna e serem detectadas. As moléculas maiores permanecem junto ao solvente e passam por fora da coluna de gel, saindo e sendo detectadas mais rapidamente.

4. Afinidade: a presença de sítio ativo específico nas enzimas pode ser explorada com o objetivo de isolamento e purificação. Utiliza-se um inibidor, um análogo do substrato ou um cofator, desde que a enzima tenha afinidade, para que ela se ligue a ele. Neste caso, temos a cromatografia por afinidade, uma vez que as proteínas ficam retidas (“grudadas”) nos sítios ativos pelos quais têm afinidade. Cada ligante deve ser específico para a enzima que se deseja purificar.



### Pesquise mais

Você pode ver a esquematização dos processos de separação e purificação de proteínas pelos princípios de carga, tamanho e afinidade, assistindo ao vídeo *Cromatografia* (2 min. e 30 s. a 6 min. e 20 s):

CROMATOGRAFIA. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=pdExSwSZUvU>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

O vídeo referenciado a seguir exemplifica o processo de purificação e o teste de atividade da enzima asparaginase. Neste caso, é utilizado um sistema chamado de ÄKTA, que combina mais de uma técnica cromatográfica com filtração para promover a purificação da enzima.

PURIFICAÇÃO e ensaio de atividade da enzima asparaginase. Disponível em: <[https://www.youtube.com/watch?v=Sf9u4\\_d--vU](https://www.youtube.com/watch?v=Sf9u4_d--vU)>. Acesso em: 6 fev. 2018.

## Sem medo de errar

Denise começou seu checklist para levantar as etapas que possibilitariam a presença de proteínas indesejáveis no biofármaco produzido com princípio ativo de L-asparaginase.

Como essa enzima é uma secreção da *E. coli* encontrada fora do conteúdo celular, o primeiro cuidado que Denise deve adotar para separá-la é não romper as células, o que aumentaria a quantidade e o tipo de compostos no extrato. O processo que ela usou para manter a qualidade do biofármaco foi o fluxo de etapas de filtração e centrifugação, conservando a temperatura em torno de 4 °C para garantir a atividade enzimática, assim como a aplicação de solução-tampão para estabilizar o valor do pH em valores próximos ao ótimo para essa enzima. Mesmo assim, isso ainda não é o suficiente para a produção de enzima de alta pureza. E ela percebeu que a falha do processo estava justamente aí. Deveria utilizar um método mais preciso para o isolamento e a purificação da L-asparaginase.

Denise decide então acrescentar uma última etapa de cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna que apresenta como enchimento o aminoácido asparagina, substrato específico para a enzima que se deseja purificar. A enzima será dissolvida na fase móvel que entra na coluna e ficará retida na fase estacionária por apresentar afinidade com a asparagina. Assim, separam-se as outras substâncias consideradas contaminantes, que saem da coluna primeiro. Uma segunda solução escolhida por Denise será responsável por alterar a polaridade do ambiente da coluna, rompendo a ligação entre as enzimas e os aminoácidos e fazendo com que elas saiam da coluna em um segundo momento com alto grau de pureza e mantendo sua atividade terapêutica.

## Avançando na prática

### Análise do mosquito *Aedes*

#### Descrição da situação-problema

Em estudo sobre o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor dos vírus causadores da dengue, zika e chikungunya, foram realizadas análises completas do animal: genoma, expressão gênica, composição e comportamento. Os resultados mostraram que, apenas em caso de infecção com o vírus Zika, o mosquito apresenta 13 lipídios específicos e idênticos. Como os pesquisadores podem utilizar essa informação?

## Resolução da situação-problema

Nós vimos que a identificação de função e obtenção de determinadas macromoléculas funcionam não apenas para o desenvolvimento de compostos ativos dos biofármacos, mas podem se tornar alvos deles.

É essa informação útil que se extrai desses resultados.

A presença dos 13 lipídios apenas nos mosquitos que estão infectados com o vírus Zika faz com que essas moléculas juntas tornem-se marcadores da presença do vírus.

O estudo mais aprofundado mostrou que essas moléculas são importantes para que o vírus consiga entrar e se multiplicar nas células, tornando-se portanto potenciais alvos terapêuticos, uma vez que ao utilizar biofármaco que contenha enzima capaz de quebrar esses lipídios, eles perdem a função, e o desenvolvimento do vírus é controlado.

### Faça valer a pena

**1.** Os biofármacos são medicamentos biológicos ou obtidos por processos biológicos. Têm ganhado cada vez mais espaço pela alta especificidade nos tratamentos e maior chance de sucesso, especialmente em casos em que os tratamentos tradicionais não apresentam resultados positivos.

Sobre a ação das enzimas como composto ativo dos biofármacos, marque a alternativa correta.

- a) As enzimas atuam apenas realizando a lise de outras enzimas.
- b) Quando é identificado um substrato que é essencial ao desenvolvimento da doença, uma enzima específica para ele pode ser utilizada como biofármaco.
- c) Enzimas específicas para substratos proteicos podem ser utilizadas em diversos tipos de tratamentos, que incluem, como moléculas-alvo, lipídeos e íons livres, por exemplo.
- d) Todas as proteínas/enzimas extraídas de um microrganismo recombinante apresentam ação terapêutica e entram na formulação do biofármaco.
- e) As moléculas-alvo do tratamento também são extraídas dos microrganismos e administradas junto do biofármaco.

**2.** As enzimas, quando aplicadas como princípio ativo dos biofármacos, devem apresentar grau de pureza muito maior que aquelas utilizadas pela indústria de alimentos e de detergentes. Para isso, existem diversas técnicas de isolamento e purificação de enzimas.

Assinale a alternativa que explica corretamente a técnica utilizada no isolamento e na purificação de enzimas para fins farmacêuticos.

- a) Afinidade, embasada na polaridade das enzimas.
- b) Insolubilização da enzima, afastando o pH do meio do ponto isoelétrico.
- c) Uso de solventes orgânicos.
- d) Cromatografia em gel, baseada no tamanho das moléculas.
- e) Aplicação de sal em excesso para desnaturar as enzimas.

**3.** A técnica de DNA recombinante é amplamente utilizada na obtenção de proteínas/enzimas que atuam como composto ativo nos biofármacos. São aplicadas principalmente em microrganismos, pela maior facilidade de trabalhar com organismos unicelulares.

Baseado em seus conhecimentos sobre a tecnologia do DNA recombinante, utilizada em células microbianas para produzir compostos terapêuticos, marque a opção correta.

- a) São escolhidos microrganismos não patogênicos e que possuam no genoma gene que codifica para a enzima de interesse.
- b) Existe a necessidade de sempre adicionar ao genoma do microrganismo um gene humano, já que o tratamento é direcionado a humanos.
- c) Identificada a enzima com potencial terapêutico e um organismo que possua gene com informação para sua produção, este gene será inserido em um microrganismo para iniciar a produção da proteína.
- d) A célula microbiana se especializa na produção da proteína e deixa de replicar.
- e) O microrganismo recombinante passará a produzir a enzima sob quaisquer condições, independentemente do meio em que se encontra.

## Seção 3.3

### Diversidade dos biofármacos e sua utilização

#### Diálogo aberto

Para aprimorar seus conhecimentos na área, Denise teve a oportunidade de visitar e conduzir uma produção experimental de vitamina C em um laboratório que apresenta o produto em sua linha de produção. Os testes de qualidade mostraram que o biofármaco estava contaminado com outros produtos de fermentação, tais como aldeídos e álcoois. Processos de purificação e isolamento da vitamina C são capazes de isolar o composto ativo de interesse, porém, com a produção de compostos indesejáveis, o rendimento de vitamina foi menor. Que problema pode ter acontecido durante a produção de vitamina C conduzida por Denise? Como ela pode solucioná-lo?

#### Não pode faltar

##### **Biofármacos: insulina, GH, vitamina C**

Para entender o que são, a importância e as etapas de processamento (operações unitárias) envolvidas na produção dos biofármacos, acabamos estudando de forma mais aprofundada os processos das enzimas lactase e L-asparaginase.

Também já comentamos que o mercado de biofármacos é crescente assim como sua parcela entre outros medicamentos. Por isso, as aplicações vão muito além, e são esses diferentes tipos de biofármacos que conheceremos a partir de agora.

A insulina e o GH são hormônios e, embora produzidos por células especializadas diferentes e com objetivos diferentes, apresentam em sua estrutura a complexidade de serem compostos por proteínas e lipídios.

Mesmo sendo de estrutura mais complexa que as enzimas que vimos até o momento, nada impede que sejam produzidas laboratorialmente e atuem como biofármacos no tratamento de enfermidades.

A insulina é um hormônio secretado pelo pâncreas com importante função no metabolismo de carboidratos no sangue. Sua ausência/deficiência é associada ao desenvolvimento de diabetes, enquanto seu excesso pode ocasionar quadros de hipoglicemia.

Para ser produzida como biofármaco destinado aos diabéticos, também se utiliza a tecnologia do DNA recombinante, a partir de genes humanos da insulina expressos em *E. coli* transgênica.

O produto apresenta-se na forma de suspensão branca e leitosa e é comercializado como produto injetável, como pode ser visto na Figura 3.4.

Figura 3.4 | Insulina humana injetável



Fonte: <<https://pixabay.com/pt/insulina-diabetes-alimentar-2331764/>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

O GH é o hormônio de crescimento, responsável por estimular o crescimento e a reprodução celular em humanos, sendo utilizado para reposição em pacientes com deficiência do hormônio.

É produzido também em *E. coli* por tecnologia de DNA recombinante, que secreta o hormônio como proteína para o espaço entre a parede celular e a membrana plasmática bacteriana. A cuidadosa ruptura da parede celular, mantendo intacta a membrana interna, permite separar o hormônio de crescimento humano da maior parte das proteínas bacterianas, chegando-se assim a um GH de alta pureza.



Eutropin e Somatrop são exemplos de nomes comerciais do GH de diferentes laboratórios.

A vitamina C, também denominada ácido ascórbico, é uma vitamina e possui estrutura menos complexa, ou pelo menos menor que a dos hormônios que acabamos de ver. Não é administrada a pacientes portadores de doenças com propósito de tratamento, mas, na maioria das vezes, como suplemento em dietas deficientes nessa vitamina. A produção de vitamina C industrial é feita por fermentação.

A glicose, substrato dos microrganismos, passa a D-sorbitol e deste é reduzida a L-sorbose por ação de *Acetobacter suboxidans* ou *Gluconobacter oxidans*.

O emprego de *Erwinia* e *Corynebacterium* promove duas passagens fermentativas: a oxidação da L-sorbose a ácido 2-5 diceto-D-glucônico e a redução deste a 2-ceto L-gulônico, que é então quimicamente transformado em ácido L-ascórbico (vitamina C), apresentando-se como sólido branco e cristalino, inodoro e de sabor ácido.

### **Biofármacos: medicamentos para o câncer, para asdoenças infecciosas**

Muitas pesquisas são desenvolvidas com o objetivo de encontrar cura e melhores tratamentos para diferentes tipos de câncer e, por isso, quando se fala em biofármacos, a facilidade de encontrar informações e tipos diversificados de medicamentos para essa doença é muito maior.

Vimos que a enzima L-asparaginase é exemplo de um deles, e o quadro a seguir apresenta outros biofármacos utilizados nos tratamentos de câncer.

Quadro 3.2 | Biofármacos aplicados aos tratamentos de câncer

Biofármaco	Aplicação/Tipo de câncer
Rituximabe	Linfoma tipo B
Bevacizumabe	Câncer colorretal metastático e câncer de pulmão
Trastuzumabe	Câncer de mama

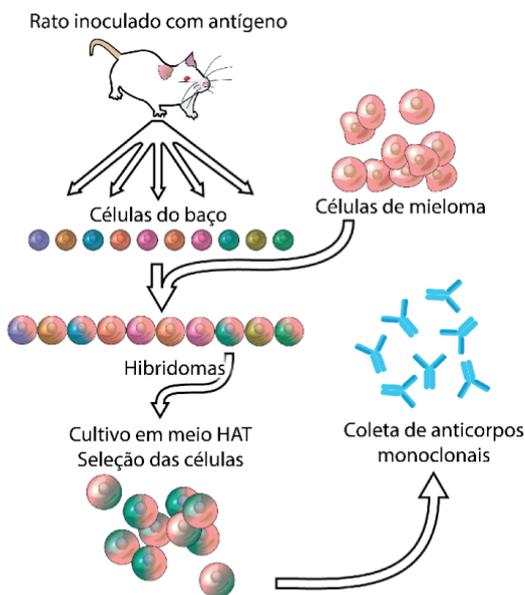
Fonte: elaborado pela autora.

Todos são anticorpos monoclonais (produzidos de um único clone de um único linfócito B parental), capazes de reconhecer e se ligar a antígenos de interesse, atacando assim as células cancerígenas.

São produzidos a partir de linfócitos B gerados por camundongos, cujo sistema imunológico foi estimulado pelo antígeno de interesse. Por engenharia genética, esses anticorpos foram adaptados ao organismo humano, quando os genes que codificam essas proteínas tiveram removida a região que causa reação imunológica ao organismo humano, e passaram a ser chamados anticorpos monoclonais humanizados.

A figura a seguir apresenta o esquema de produção desses anticorpos.

Figura 3.5 | Produção de anticorpos monoclonais a partir de camundongos



Fonte: adaptada de <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cb/Monoclonals-gl.png>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

Perceba que o camundongo é inoculado com o antígeno – neste caso, as células tumorais – para que produza anticorpos específicos contra elas, e depois que estes anticorpos são liberados pela célula (substrato), são recolhidos/separados para atuarem como os compostos ativos de medicamentos, como os que estudamos.

O biofármaco que tem como composto ativo a substância **palivizumabe** é indicado para aumentar a proteção de bebês prematuros contra a infecção pelo vírus sincicial respiratório (VRS).

É também um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado, direcionado para o sítio antigênico A da proteína de fusão do vírus sincicial respiratório (VSR). Depois de humanizado, apresenta 95% de seqüências de aminoácidos humanos e 5% de camundongos, sendo **comercializado com o nome de Synagis**.



### Lembre-se

Você se lembra de que vimos na nossa primeira unidade de estudos como essa região de reação imunológica a humanos poderia ser removida dos genes que codificarão o antígeno para evitar possível rejeição? Se pensou no uso de enzimas de restrição, está correto!

O Interferon Alfa 2b humano recombinante é outro biofármaco conhecido, usado no tratamento de hepatite, uma inflamação do fígado causada por agentes infecciosos. Foi produzido pela primeira vez no Brasil pela Fiocruz e é distribuído gratuitamente pelo SUS (Sistema Único de Saúde).

Diferentemente do **palivizumabe**, é uma proteína produzida por tecnologia de DNA recombinante expresso em *E. coli*, injetável, e sua atividade antiviral está baseada no fato de se combinar aos receptores superficiais celulares específicos e inibir a penetração, proliferação e liberação dos vírus.

### **Biofármacos: medicamentos para as doenças autoimunes e para a AIDS**

As doenças autoimunes normalmente apresentam seus sintomas no organismo humano acometido por elas por longos anos, por isso a maioria dos tratamentos são direcionados no sentido de minimizar esses sintomas e promover melhores condições de vida ao paciente.

Os biofármacos são indicados para terapias mais avançadas, quando o corpo não responde mais aos tratamentos tradicionais.

Psoríase, artrite reumatoide, lúpus e AIDS são exemplos dessas doenças, e alguns estudos têm sugerido que a alteração da flora intestinal pode ser boa aliada no tratamento.

Isso porque perceberam que a presença de duas proteínas (N-acetil-glucosamina-6-sulfatase (GNS) e a filamina A (FLNA)), produzidas por bactérias intestinais, provocam reações imunes. Assim, mudanças na flora bacteriana intestinal poderiam funcionar como uma intervenção clínica.



### Assimile

Aqui, a biotecnologia entra na produção de microrganismos, bactérias benéficas, que colonizam o intestino humano competindo com outros microrganismos que não são de interesse, havendo uma inversão da flora intestinal. Esses microrganismos são produzidos em larga escala, desidratados, encapsulados e comercializados como medicamento biológico.

A identificação de genes ou marcadores moleculares associados à doença também é caminho promissor nos tratamentos, permitindo até mesmo o desenvolvimento de fármacos personalizados, como já vimos na Seção 1.3 deste livro didático.

Outra alternativa utilizada nos tratamentos é a intervenção. Identificado o estágio crítico da doença, o paciente recebe anticorpos para agir, fazendo uma espécie de interceptação.

No caso da AIDS, causada pela infecção com o vírus HIV e uma das doenças autoimunes que mais tem crescido e levado os pacientes à morte nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de apresentar terapias mais eficazes.

O papel da biotecnologia já começa na prevenção da transmissão do vírus HIV. A soja modificada, expressando a proteína *Cianovirina-N* da alga azul (*Nostoc ellipsosporum*), é utilizada na produção de preservativos em forma de gel.

O tabaco transgênico codifica a proteína *Griffithsia* (*GRFT*) de alga vermelha (*Griffithsia corallinoides*) mediante a manipulação genética utilizando o vírus mosaico; e a *Calophyllum*, expressando a enzima *Calanolida-A*, componente isolado do látex da árvore, que é bastante eficaz para o combate do vírus HIV. Essas proteínas atuam inibindo a gp120 (glicoproteína capaz de se ligar simultaneamente ao receptor de membrana CD4+ e ao CCR5 de linfócitos T auxiliares), impedindo a adesão do vírus às células T CD4+ (leucócito que ativa outros leucócitos para atacarem antígenos). Com a descoberta dessas

novas proteínas é possível impedir a adesão do vírus nas células e evitar assim sua replicação e propagação.

O maraviroque (MVC), comercializado com os nomes de Selzentry® e Celsentri®, é anticorpo monoclonal com atividade antirretroviral administrado por via oral para uso na terapia da AIDS (aprovado pela FDA – Food and Drug Administration). Essa substância interage com glicoproteína viral impedindo a fusão do vírus às membranas da célula do hospedeiro.



### Pesquise mais

O roteiro do filme *Clube de Compras Dallas* é baseado na história real do eletricitista Ron Woodroof, cidadão americano, diagnosticado com AIDS em 1985, quando pouco se conhecia sobre a doença e seus possíveis tratamentos. Começou a terapia utilizando a droga AZT (inibidor da transcriptase reversa) e recebeu expectativa de vida de apenas 30 dias. Ao descobrir uma terapia alternativa no México, que utilizava como princípio ativo o peptídeo T (polímero de aminoácidos), conseguiu na justiça o direito de utilizá-la em tratamento próprio e viveu mais sete anos após ter recebido o diagnóstico da doença.

Na época, o uso do peptídeo T mostrava resultados mais positivos que os testes hospitalares com AZT, o que levou muitos outros pacientes a procurarem a terapia alternativa.

## Potencial mutagênico e antimutagênico de xenobióticos sintéticos e naturais

Antes de tudo precisamos entender o que são xenobióticos e quais dos fármacos que estudamos se classificam como tal.

Por definição, xenobiótico é toda e qualquer substância estranha a um organismo, que não é produzida por ele e não faz parte da sua dieta.

Então, pensando no organismo humano, o biofármaco insulina não é classificado como xenobiótico, uma vez que é um hormônio produzido em nosso organismo, enquanto que os antibióticos são substâncias totalmente estranhas ao nosso organismo.

Ainda pensando nessas classificações e no antibiótico que é classificado como um xenobiótico, ele pode ser sintético, como as sulfinamidas, ou pode ser encontrado naturalmente, produzido por organismos vivos, como é o caso dos antibióticos presentes no

própolis produzido pelas abelhas e do primeiro composto identificado com ação antibiótica, a penicilina, produzida por fungos.



## Pesquise mais

O artigo científico referenciado a seguir apresenta a evolução dos antibióticos naturais e sintéticos, descobertos, testados e aprovados, desde o ano de 1940 até os dias atuais, assim como suas estruturas químicas.

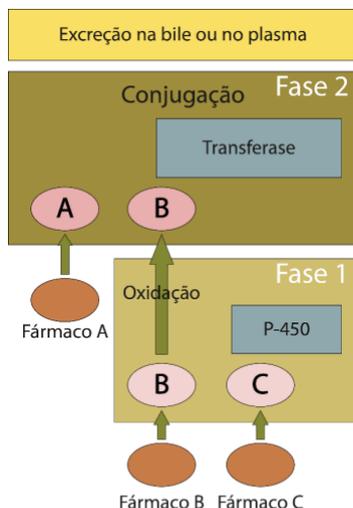
GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 3, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000300035](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300035)>. Acesso em: 7 fev. 2018.

O organismo humano metaboliza os xenobióticos e promove sua eliminação, ou desintoxicação, uma vez que corresponde a substância estranha.

Esse metabolismo acontece no fígado pelo sistema enzimático denominado P450, importante para a indústria farmacêutica por ser responsável pela degradação de medicamentos.

Como mostrado na figura a seguir, corresponderia ao fármaco C, que passa pela ação enzimática do complexo P450.

Figura 3.6 | Metabolismo hepático de um fármaco



Fonte: adaptada de <[https://it.wikipedia.org/wiki/Epatotossicita%C3%A0#/media/File:Metabolismo\\_epatico\\_dei\\_farmac.svg](https://it.wikipedia.org/wiki/Epatotossicita%C3%A0#/media/File:Metabolismo_epatico_dei_farmac.svg)>. Acesso em: 7 fev. 2018.

As cumarinas e as chalconas são moléculas derivadas de compostos fenólicos e que podem ser sintetizadas por fungos, bactérias e plantas, bem como em laboratório.

Apresentam atividade biológica antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antitumoral.

Um híbrido sintético de cumarina-chalcona foi produzido em laboratório e foi avaliado quanto à atividade, até mesmo mutagênica e antimutagênica.

Os resultados mostraram atividade antimutagênica em duas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100), ou seja, mantiveram a estrutura do DNA bacteriano (DO VALE, 2017).



### Refleta

Baseado em seus conhecimentos sobre a estrutura e a função do DNA, qual a importância de conhecer o potencial mutagênico e antimutagênico de substâncias xenobióticas que colocamos em nosso organismo? Quais as possíveis consequências que as substâncias mutagênicas poderiam apresentar a nós?

## Nanotecnologia aplicada aos fármacos

É a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica, utilizando a nanotecnologia e os nanomateriais para desenvolver fármacos dentro de um sistema chamado de liberação modificada. (FAHNING & LOBÃO, 2011, [s.p.]

A nanotecnologia é a tecnologia aplicada a objetos que apresentam dimensão de 1 a 100 nanômetros – neste caso dos fármacos, os compostos ativos utilizados nas formulações dos medicamentos. Seu principal objetivo é modificar a liberação do fármaco, produzindo, por exemplo, os fármacos de liberação prolongada ou retardada, ou, de forma geral, de liberação modificada.

O objetivo da liberação moderada é fornecer a dose terapêutica de uma droga e manter a concentração desejada, mantendo os níveis sanguíneos terapêuticos ótimos a partir de controle de velocidade e

tempo. Dessa forma, a liberação do fármaco aconteceria de forma gradativa, determinada pelas necessidades do nosso corpo.



### Pesquise mais

Os diferentes tipos de liberação são classificados como: liberação retardada, repetida, controlada, sustentada, prolongada, estendida, vetorizada e modificada.

Entenda cada um deles consultado as páginas 40 e 41 do trabalho de conclusão de curso de Fahning e Lobão, a seguir:

FAHNING, B. M.; LOBÃO, E. B. **Nanotecnologia aplicada à fármacos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, ES, 2011. Disponível em: <<http://www.ucv.edu.br/fotos/files/06.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

Os tipos de nanoestruturas utilizadas pela indústria farmacêutica para a encapsulação de ativos são lipossomas, nanopartículas poliméricas e lipídicas, ciclodextrinas, dendrímeros, entre outros, que permitem maior eficiência de encapsulação e liberação se comparadas aos sistemas de encapsulação convencionais, tais como menor variação dos níveis plasmáticos do fármaco, redução dos efeitos indesejáveis, entre outros.

Lipossomas, por exemplo, são vesículas formadas por bicamada fosfolipídica orientadas concêntricamente e utilizadas para carregar fármacos do tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e do câncer.

Não são todos os fármacos que podem ser elaborados com nanotecnologia para liberação controlada. Depende da necessidade do organismo, do objetivo terapêutico e das características do fármaco, conforme segue:

1. Velocidade de absorção e excreção nem muito lenta nem muito rápida.
2. Uniformidade de absorção no trato gastrointestinal.
3. Sem formação de metabólitos farmacologicamente ativos.
4. Possibilidade de administração de doses relativamente pequenas (125 – 135 mg).

5. Apresentação de alto índice terapêutico (TI – dose tóxica mediana dividida pela dose efetiva mediana).
6. Aplicação preferencial em condições crônicas em relação às agudas.

## Sem medo de errar

Nós aprendemos que a produção de vitamina C é feita por meio de fermentação.

Em processos fermentativos é muito importante a pureza das colônias de microrganismos empregados e a higiene dos biorreatores e quaisquer outros equipamentos/instrumentos utilizados no processo.

Se na produção de vitamina C espera-se que a glicose seja transformada a D-sorbitol e que deste seja reduzida a L-sorbose por ação de *Acetobacter suboxydans* ou *Gluconobacter oxydans*, depois oxidada a 2-5 diceto-D-glucônico, que será reduzido a 2-ceto L-gulônico, que então é transformado em ácido L-ascórbico, pela ação de *Erwinia* e *Corynebacterium*, perceba como é importante que não haja contaminação por outros microrganismos.

O uso dos microrganismos corretos garante a sequência de etapas corretas com formação dos produtos desejáveis. A contaminação por outros microrganismos é o que pode ter gerado diferentes produtos de fermentação, como os aldeídos e álcoois, que contaminarão a vitamina C.

Denise pode repetir o processo, garantindo maior assepsia dos equipamentos e instrumentos que entram em contato com as matérias-primas e produtos de fermentação e usando colônias puras dos microrganismos que farão a transformação dos substratos de acordo com o desejado.

## Avançando na prática

### Tratamento de criança com deficiência de crescimento

#### Descrição da situação-problema

João Pedro, de 5 anos, apresenta altura muito abaixo da média dos meninos de sua idade. Os pais, preocupados, levaram-

no ao médico endocrinologista e após uma série de exames foi diagnosticado um problema de saúde, que deveria ser tratado com o uso do hormônio de crescimento GH. Porém, a mãe de João Pedro ficou reticente, como a maioria das pessoas, por acreditar que o uso de hormônios pode causar outras doenças, como câncer. Explique a ela como é obtido o GH para que ela entenda que não fará mal a seu filho.

### Resolução da situação-problema

Comece explicando à mãe de João Pedro a técnica do DNA recombinante. Assim, ela entenderá que o hormônio é produzido a partir de genes humanos, portanto é o mesmo hormônio que ela e o marido produzem em seu corpo (não é xenobiótico) e não causará reações indesejáveis como ela teme.

Como a necessidade de produção do fármaco é em maior quantidade, utiliza-se um microrganismo, a *E. coli*, de fácil manipulação e rápida reprodução, que recebe o gene humano e secreta o hormônio como proteína para o espaço entre a parede celular e a membrana plasmática bacteriana. Posteriormente, processos de isolamento e purificação do hormônio garantem produto de alta pureza, sem contaminações, muito menos da célula bacteriana patogênica que o produz.

### Faça valer a pena

**1.** A insulina é hormônio produzido pelas células pancreáticas e atua no metabolismo de carboidratos. Altas produções desse hormônio causam a hipoglicemia, enquanto que a deficiência dele gera o diabetes, doença crescente em todo mundo e tratada com injeções de insulina.

Sobre a produção industrial de insulina destinada ao tratamento de diabetes e suas características, assinale a alternativa correta:

- a) É produzida como anticorpo monoclonal, a partir de células infectadas com o antígeno.
- b) Pode ser caracterizada como um xenobiótico ao organismo humano.
- c) Utiliza nanotecnologia, sendo um medicamento de liberação controlada.
- d) É produzida a partir de fermentação da *E. coli* em meios açucarados.
- e) Aplica-se a técnica de DNA recombinante, inserindo o gene humano produtor de insulina na bactéria *E. coli*.

**2.** Os medicamentos denominados xenobióticos são aqueles não produzidos pelo organismo humano e que não fazem parte da nossa constituição ou dieta, por isso são considerados substâncias estranhas.

Dentre as alternativas a seguir, marque a que apresenta um exemplo de medicamento classificado como xenobiótico:

- a) Vitamina C.
- b) Antibióticos.
- c) Hormônio de crescimento GH.
- d) Insulina.
- e) Interferon alfa 2.

**3.** Os medicamentos de liberação controlada são produzidos por nanotecnologia com o objetivo de fornecer doses exatas nos tempos exatos aos pacientes em tratamento.

Apenas uma alternativa apresenta uma característica/definição correta sobre esse tipo de medicamento. Assinale-a:

- a) A tecnologia pode ser aplicada a qualquer tipo de medicamento.
- b) São medicamentos administrados em doses altas, acima de 500 mg.
- c) Os diferentes tipos de liberação do fármaco são classificados como: liberação retardada, repetida, controlada, sustentada, prolongada, estendida, vetorizada e modificada.
- d) A tecnologia sempre é utilizada para aumentar a velocidade de liberação do fármaco, garantindo sua concentração na corrente sanguínea.
- e) A injeção de insulina é um exemplo de fármaco de liberação controlada.

# Referências

A PRODUÇÃO de proteínas terapêuticas. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=FlrizEOinoQ>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

ALISSON, E. **Pesquisadores identificam alvo terapêutico para alguns tipos de câncer**. Agência FAPESP, 2015. Disponível em: <[http://agencia.fapesp.br/pesquisadores\\_identificam\\_alvo\\_terapeutico\\_para\\_alguns\\_tipos\\_de\\_cancer/21138/](http://agencia.fapesp.br/pesquisadores_identificam_alvo_terapeutico_para_alguns_tipos_de_cancer/21138/)>. Acesso em: 6 fev. 2018.

APIFARMA. **Medicamentos biotecnológicos**. Disponível em: <<https://www.apifarma.pt/apifarma/areas/biotecnologia/Paginas/Medicamentosbiotec.asp>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

CROMATOGRAFIA. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=pdExSwSZUvU>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

DAMIÃO, N. T. C. **A biotecnologia e os fármacos**. BiotecAHG, 2014. Disponível em: <<http://www.biotec-ahg.com.br/index.php/pt/acervo-de-materias/assuntos-diversos/837-a-biotecnologia-e-os-farmacos>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

DE MIRANDA, A. S. et al. Maraviroque: uma inovação terapêutica para o tratamento da AIDS. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 130-139, out. 2010. Disponível em: <<http://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/78/127>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

DINÂMICA celular: prática 8: enzima catalase. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=g2LD8xNQqHw>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

DO VALE, C. R. **Avaliação das atividades genotóxica, antigenotóxica, mutagênica, antimutagênica e recombinogênica do híbrido cumarina-chalcona (7-metoxi-3-(e)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilóil)-2h-cromen-2-ona) em bactérias, camundongos e *Drosophila melanogaster***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2017. Disponível em: <[https://pos.icb.ufg.br/up/101/o/Tese\\_vers%C3%A3o\\_final\\_2017-\\_se\\_Deus\\_quiser.pdf](https://pos.icb.ufg.br/up/101/o/Tese_vers%C3%A3o_final_2017-_se_Deus_quiser.pdf)>. Acesso em: 6 fev. 2018.

FAHNING, B. M.; LOBÃO, E. B. **Nanotecnologia aplicada à fármacos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, ES, 2011. Disponível em: <<http://www.ucv.edu.br/fotos/files/06.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

FERREIRA NETO, P. J. **Isolamento e purificação parcial de L-asparaginase produzida por actinobactéria em solo do Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015. 90 f. Disponível em: <<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5696>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

GUARNIERI, M. et al. Fármacos de origem biotecnológica na terapêutica do vírus HIV. **Unilus Ensino e Pesquisa**, v. 12, n. 27, 2015. Disponível em: <<http://revista.lusiada.br/index.php/ruep/article/view/271>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

- INSULINA humana recombinante. Disponível em: <<http://www.far.fiocruz.br/insulina-humana-recombinante/>>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. 2. ed. v. 3. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2001. 593 p.
- NANOTECHNOLOGY to end insulin injections for diabetics. Disponível em: <[https://www.youtube.com/watch?v=rY\\_siujVJEg](https://www.youtube.com/watch?v=rY_siujVJEg)>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando 'Saccharomyces cerevisiae' W303-181**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2003.
- NOSSA capa: Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 5, p. I, out. 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442009000500001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442009000500001)>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- PINHEIRO, A. W.; POMPILHO, W. M. O ensino de enzimas: uma abordagem experimental de baixo custo. **Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular**, n. 1, 2011.
- PRODUÇÃO de insulina por engenharia genética. Disponível em: <<http://www.medicinageriatrica.com.br/2013/01/16/terapia-genica-producao-de-insulina/>>. Acesso em: 6 fev. 2017.
- PURIFICAÇÃO e ensaio de atividade da enzima asparaginase. Disponível em: <[https://www.youtube.com/watch?v=Sf9u4\\_d--vU](https://www.youtube.com/watch?v=Sf9u4_d--vU)>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- RESUMOS da Biblioteca Virtual FAPESP. Disponível em: <[http://bv.fapesp.br/pt/pesquisa/?q2=\(area\\_exact:%22Asparaginase%22%20OR%20assuntos\\_exact:%22Asparaginase%22\)%20AND%20id\\_pesquisador\\_exact:36314](http://bv.fapesp.br/pt/pesquisa/?q2=(area_exact:%22Asparaginase%22%20OR%20assuntos_exact:%22Asparaginase%22)%20AND%20id_pesquisador_exact:36314)>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- SOMATROP. Disponível em: <<http://www.bulas.med.br/p/bulas-de-medicamentos/bula/5202/somatrop.htm>>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- TAHALL, L. et al. E. coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. *Cancer*, v. 25, n. 2, p. 306-320, 1970.
- VASCONCELOS, Y. Foco nos biofármacos. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, ed. 249, nov. 2016. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/11/18/foco-nos-biofarmacos/>>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- WASHINGTON, M. P. L. **Modelagem do processo de produção da L-asparaginase recombinante utilizando a abordagem dinâmica da análise do balanço de fluxos metabólicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2016. Disponível em: <<http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/producao-academica/dissertacoes-de-mestrado/2016/437--18/file>>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- ZIMMER, K. R. et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez. 2009.



# Biotecnologia e suas aplicações clínicas na genética forense

### Convite ao estudo

Bem-vindo de volta, caro aluno.

Chegamos à nossa última unidade de ensino e por aqui o conhecimento continua intenso e conectado a tudo que há de mais atual nas áreas da medicina, farmacêutica e alimentos.

Agora, a Biotecnologia vai nos ensinar como é possível produzir vacinas contra diversos tipos de infecções bacterianas e virais, e ao mesmo tempo permitir a identificação delas pelo desenvolvimento de kits diagnóstico.

Também vai nos ensinar os modernos tratamentos por terapia gênica, que podem ser mais eficientes e precisos do que os tratamentos convencionais, podendo se estender pela vida toda.

E, por fim, você já conseguiu imaginar como o conhecimento das bases nitrogenadas que compõem o genoma humano pode fornecer informações para o diagnóstico de diversos tipos de doenças que ainda não se manifestaram e possibilitar um tratamento profilático?

Até parece filme de ficção científica, mas não é.

A Biotecnologia permitiu e continua permitindo inúmeros avanços nas diversas áreas que estudamos, e esse é o presente e o futuro.

Então, vamos juntos aprender o que mais o mundo das nanomoléculas pode nos oferecer.

# Seção 4.1

## Vacinas, soros e kits diagnósticos

### Diálogo aberto

Os conhecimentos de biotecnologia permitiram às áreas bioquímica e médica o desenvolvimento de análises, produtos e terapias que previnem, diagnosticam e tratam doenças. As vacinas permitem o tratamento profilático de diversas doenças tornando a população-alvo imune a elas a partir da produção de seus próprios anticorpos. Em casos em que o contato com o agente causador de uma enfermidade já ocorreu e não existe tempo suficiente para a reação do organismo, os soros tornam-se boa opção. Além disso, problemas de saúde que não são causados por agentes externos, mas por origem genética, também puderam ser identificados por modernas análises de DNA que utilizam marcadores moleculares ou até mesmo sequências completas, e representam um futuro promissor com as novas tecnologias desenvolvidas como tratamentos.

Como profissional de saúde, você está constantemente sendo questionado por pessoas com dúvidas sobre as vacinas e as diversas campanhas de vacinação. Este é historicamente um tema muito polêmico no mundo e no Brasil, bastando lembrar da Revolta da Vacina, em 1904, e dos movimentos antivacina que existem atualmente, associando erroneamente a aplicação de vacina a uma maior incidência de autismo.

Grande parte do medo da população pode ter a ver com o fato de que as vacinas são produzidas com os próprios vírus que causam as doenças. Esta é uma ideia muito rasa e simplista sobre vacinas, já que elas têm diversas formas de produção e várias proporções do vírus patológico. Desta forma, entender o processo de desenvolvimento, validação e produção destes produtos biotecnológicos é essencial para que você possa demonstrar que as vacinas são seguras e necessárias para a saúde da população como um todo.

No caso de alguém lhe perguntar por que não podemos trocar os vírus das vacinas por qualquer outra coisa que possa proteger da mesma

forma, como você responderia? E no caso de uma mulher grávida que quer saber por que ela deve tomar a vacina contra gripe neste ano se ela já tomou a vacina no ano passado, o que você diria a ela?

## Não pode faltar

### Biotecnologia para a produção de vacinas - hepatite B

Na unidade anterior, chegamos a comentar um exemplo da produção de vacinas quando falamos do uso de microrganismos no ramo da farmacêutica.

Vimos que as vacinas podem conter o microrganismo causador da doença amenizado ou inativo, com o objetivo de estimular o organismo humano a produzir anticorpos específicos para aquele microrganismo.



#### Pesquise mais

Curiosamente, esse conhecimento surgiu na China por volta do ano de 1798, quando Edward Jenner observou lesões presentes nas mãos de ordenhadeiras (pessoa que ordenha leite das tetas de mamíferos) devido ao contato com a varíola bovina. Durante epidemias de varíola humana, as ordenhadeiras não contraíam a doença. Assim, ele percebeu que o material retirado das lesões de varíola de bovinos era protetor contra a varíola humana, e ele mesmo chegou a se imunizar com esse material (LIMA et al., 2001).

As vacinas são classificadas como bacterianas e virais, dependendo do tipo de microrganismo utilizado/alvo, e são utilizadas há mais de 200 anos sendo responsáveis pelo controle de nove principais doenças em algumas partes do mundo: varíola, difteria, tétano, febre amarela, coqueluche, poliomielite, sarampo, caxumba e rubéola (LIMA et al., 2001).

De forma geral, para a produção de vacinas tanto virais quanto bacterianas, alguns cuidados devem ser adotados:

1. Temperatura de cultivo das células ao redor de 37°C.
2. Rigorosas condições de assepsia, uma vez que a temperatura e o pH (aproximadamente 7,5) favorecem o desenvolvimento de contaminação indesejada.

3. Cuidado com a patogenicidade da grande maioria dos microrganismos envolvidos no preparo das vacinas.
4. As substâncias de interesse (antígenos) não são o produto principal do processo metabólico para a produção de vacinas, como é o caso do etanol em alguns processos fermentativos; portanto, a purificação do extrato é etapa muito importante na produção de vacinas.

A hepatite B é uma doença causada pelo vírus VHB que ataca as células do fígado, provocando uma reação inflamatória crônica (PINHEIRO; ZEITOUNE, 2008).

A prevenção da doença é feita pela administração de três doses da vacina contra hepatite B: a segunda 30 dias após a primeira e a terceira seis meses após a primeira.

Para a produção de vacinas virais, o caso da hepatite B e de outras doenças que veremos em seguida, como gripe e dengue, algumas generalidades podem ser adotadas.

A reprodução dos vírus é realizada por cultivos *in vitro* em células animais, ou podem ser obtidas culturas diretamente de órgãos de animais, como rins de macaco ou cobaia.

A reprodução do vírus pode ou não provocar a lise celular, e posteriormente o vírus deve ser separado, purificado, inativado ou não, para dar origem à vacina correspondente.

Para a produção da vacina da hepatite B, ocorre a inserção de um plasmídeo contendo o antígeno de superfície do vírus VHB em levedura.

Neste caso, a vacina não provoca infecção porque não contém o DNA viral, e a vacinação induz apenas a produção de anticorpos específicos ao antígeno injetado.

Para preservar a atividade da proteína, a vacina deve ser mantida em geladeira e não pode ser congelada, e a administração pode ser feita em combinação a outros tipos de vacina.



### Exemplificando

Vacinas combinadas apresentam múltiplos antígenos para prevenir diferentes doenças ou proteger contra múltiplas cepas. A pentavalente distribuída pela rede pública contém vacina para hepatite B, *influenza* tipo B e DTP (tríplice bacteriana: difteria, tétano e coqueluche).

## Biotecnologia para produção de vacinas - influenzavírus

O vírus *influenza* é o agente causador da gripe. Existem três tipos deste vírus, denominados *influenza* A, B e C, sendo os dois primeiros de maior preocupação por serem ressonáveis por epidemias sazonais. O subtipo A (H1N1) circula atualmente entre humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/influenza>>).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a vacinação a melhor forma de controlar a circulação dos vírus *influenza*, e por isso, no Brasil, a vacina é distribuída gratuitamente aos grupos populacionais de risco.



### Pesquise mais

Consulte a lista de pessoas que devem obrigatoriamente ser vacinadas contra o vírus *influenza* nos itens "E quem deve tomar a vacina contra a gripe?" e "Além deles, foram incluídos novos públicos-alvo na campanha de 2017?", da reportagem *Vacina da gripe: o que muda em 2017*, disponível em: <<https://saude.abril.com.br/medicina/vacina-da-gripe-o-que-muda-em-2017/>>, acesso em: 9 jan. 2018.



### Refleta

Você já deve ter ouvido falar que o vírus da gripe passa por muitas mutações e que, a cada ano, se torna diferente. Pense no porquê dessas mutações. Como elas podem afetar o desenvolvimento de vacinas e os tratamentos?

Como consequência dessas mutações, a OMS convoca duas consultas técnicas nos meses de fevereiro e setembro para recomendar amostras de vacinas candidatas que entrarão na formulação das vacinas contra a *influenza* sazonal. Nessas pesquisas semestrais são estudados os novos tipos de vírus *influenza* que podem ter surgido para que também sejam utilizados na formulação da vacina, que deve apresentar cobertura eficaz contra a infecção.

A multiplicação dos vírus *influenza* para a produção de vacinas é feita em ovos de galinha fertilizados, que são incubados para o desenvolvimento do embrião.

Geralmente, uma dose de vacina corresponde a um ovo.

A inoculação do vírus *influenza* nos ovos é feita de forma automática, evitando ao máximo os riscos de contaminação, pela ação de uma agulha que faz um furo no topo da casca e outra que injeta o vírus na cavidade alantoica (estrutura ligada à parte posterior do intestino do embrião).

Depois os ovos são incubados para permitir a reprodução dos vírus.

Os ovos são, então, colocados em câmara fria para provocar a morte do embrião, retraindo os vasos sanguíneos e liberar o vírus no líquido alantoico, que é colhido a partir de um corte realizado no topo da casca do ovo.

Para a obtenção do vírus puro, são aplicadas técnicas de separação e purificação que aprendemos na Unidade 3, como filtração, centrifugação e cromatografia.

Neste extrato é adicionado detergente para que ocorra a fragmentação do vírus, e a suspensão viral fragmentada formada será inativada pela adição de formaldeído, para que o vírus não tenha capacidade de se replicar, infectar e causar doença nas pessoas que receberão a vacina.

Por fim, é feita a formulação da vacina pela mistura com outras substâncias, para que fique com a composição e diluição final.



### Pesquise mais

A reportagem apresentada pelo programa de TV Fantástico apresenta, de forma detalhada e bastante ilustrativa, o processo de produção da vacina da gripe a partir de ovos de galinha. Assista a partir do link <<http://g1.globo.com/fantastico/videos/t/edicoes/v/entenda-como-e-o-processo-de-fabricacao-da-vacina-contr-o-h1n1/4947262/>>, acesso em: 8 dez. 2017.

## **Biotecnologia para produção de vacinas - dengue e outras em desenvolvimento**

O vírus da dengue é transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* e se tornou a doença viral que se espalha mais rapidamente pelo mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>>. Acesso em: 8 dez. 2017).

No Brasil, já foram identificados quatro sorotipos da doença (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), e todos podem causar tanto a forma clássica da doença como a hemorrágica (mais grave) (Instituto Oswaldo Cruz).

O laboratório Sanofi Pasteur desenvolveu vacina para a dengue, mas as pesquisas continuam porque o uso dela ocasionou o desenvolvimento de formas mais graves da doença em algumas pessoas.

A doença não é desencadeada pela vacina, mas, sim, quando o indivíduo tem um contato posterior com o vírus por meio da picada do mosquito infectado e por isso, a vacina não é indicada para pessoas soronegativas (que nunca tiveram contato com o vírus).

Em estudo realizado nos EUA, a imunização com três doses da vacina Sanofi gerou uma resposta de anticorpos séricos neutralizantes contra os quatro sorotipos do vírus causadores de dengue em 100% dos indivíduos avaliados no estudo, porém só 66% das pessoas imunizadas se tornaram resistentes.

Vacinas eficazes apresentam cobertura acima de 90%.

Esta vacina é produzida com o vírus vivo, porém enfraquecido, e, como as demais vacinas, estimula o sistema imunológico a produzir anticorpos contra o vírus da dengue.

A maior preocupação que também se apresenta em fase de estudo é o fato de o mosquito transmissor do vírus da dengue poder estar infectado e também transmitir o vírus da Zika, febre amarela e chikungunya.

A revista científica *Nature Immunology* publicou uma pesquisa que alerta para o risco de a vacina da dengue potencializar a ação do vírus da Zika no organismo (HARRISON, 2016).

No Brasil, o Instituto Butantan também vem realizando pesquisas para chegar a uma fórmula eficiente para a vacina contra dengue.

O projeto é desenvolvido em parceria com outras instituições, e já iniciaram a fase III do estudo.

Na fase I, o objetivo foi demonstrar que a vacina está apta a ser usada em humanos, como exigência de segurança. Na II, o foco também é a segurança, mas se observa a capacidade de a vacina estimular o sistema imunológico na produção de anticorpos. E a III busca avaliar se a pessoa vacinada está protegida contra a infecção. Nesta fase, o instituto conta com a participação de 17 mil voluntários.

Outras vacinas de doenças que vêm crescendo em regiões específicas ou até mundialmente vêm sendo pesquisadas (produção ou eficácia).

O Quadro 4.1 apresenta alguns laboratórios/instituições que têm participado ativamente dessas pesquisas e os tipos de vacinas que vêm desenvolvendo.

Quadro 4.1 | Vacinas em desenvolvimento e melhoramento no Brasil

Instituto Butantan	Fiocruz	Sanofi Pasteur
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dengue</li> <li>- Rotavírus</li> <li>- Pneumococo</li> <li>- Onco-BCG recombinante para o tratamento de câncer de bexiga</li> <li>- BCG recombinante Pertussis contra coqueluche neonatal</li> <li>- DTPlow</li> <li>- Heptavalente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zika, em parceria com o laboratório Sanofi Pasteur</li> <li>- Esquistossomose</li> <li>- Fasciolose hepática</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Clostridium difficile</i>, infecções hospitalares;</li> <li>- Tuberculose, mais efetiva para proteger adolescentes e adultos</li> <li>- Aids</li> <li>- Poliomielite</li> <li>- Hexavalente: difteria, tétano, coqueluche, hepatite B, poliomielite e infecções por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo B</li> <li>- Meningite</li> </ul>

Fonte: adaptado de Instituto Butantan (s.d.); Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (2014); Sanofi Pasteur (s.d.).

## Biotecnologia para produção de soros

Os soros são produtos de biotecnologia que, ao contrário da vacina, já apresentam em sua composição os anticorpos para combater determinado antígeno.

São produzidos a partir de animais imunizados, ou seja, esses animais receberam o antígeno e tiveram o sistema imunológico estimulado a produzir o anticorpo, que é separado e faz parte da composição do soro.



### Assimile

A vacina contém o antígeno, enquanto o soro contém o anticorpo. A vacina é usada como tratamento preventivo, estimulando o organismo na produção de anticorpos. O soro é usado para tratamento emergencial, fornecendo ao organismo que já foi invadido pelo antígeno os anticorpos de que ele necessita. Ambos atuam como imunizadores, mas em momentos diferentes.

A imunidade conferida pelos soros é denominada passiva, uma vez que o organismo que o recebeu não aprendeu a produzir estes anticorpos, mas recebeu os produzidos em outro organismo.

A produção do soro é realizada em outro ser vivo, normalmente mamífero de grande porte, sendo o cavalo um animal bastante utilizado.

Ele recebe doses controladas do antígeno, como se recebesse a vacina, e passa a produzir anticorpos contra este.

Depois, o sangue do animal é retirado e o plasma separado e submetido a processos físicos e químicos para a purificação das imunoglobulinas.

Os soros são conhecidos principalmente pela aplicação no tratamento de picadas por animais peçonhentos (cobra, aranha), mas também pode ser utilizado contra algumas toxinas bacterianas e na rejeição de órgãos transplantados.

O Instituto Butantan (<[www.butantan.gov.br](http://www.butantan.gov.br)>) produz 13 tipos de soros (antígenos específicos preparados com os venenos de serpentes, aranhas, escorpiões e lagartas) a partir da criação de 800 cavalos.

A Figura 4.1 mostra a coleta do veneno de uma cobra que será injetado no organismo de cavalos, em doses controladas e seguras, para iniciar o processo de produção dos anticorpos.

Figura 4.1 | Coleta do veneno de cobra



Fonte: <[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/32/Snake\\_Milking.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/32/Snake_Milking.jpg)>. Acesso em: 9 dez. 2017.



## Pesquise mais

Você também pode ver todo o processo de produção do soro antiofídico, que trata mordidas de cobras venenosas, acessando o link <<https://www.youtube.com/watch?v=LjUCcuyAdA4>>, acesso em: 9 nov. 2017.

### **Kits para diagnóstico desenvolvidos por biotecnologia**

Na produção de testes para diagnóstico, a maior preocupação e esforços no desenvolvimento são voltados à capacidade de identificar o patógeno com a maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade possíveis.

Os kits para diagnóstico de patógenos causadores de doenças são classificados de duas formas:

1. Os que fazem a detecção direta do agente infeccioso.
2. Os que determinam a presença de anticorpos produzidos pelo organismo infectado.

No primeiro caso, pode-se trabalhar com anticorpos monoclonais aplicados em testes tipo Elisa (diagnóstico de doenças que induzem a produção de imunoglobulinas) ou testes de aglutinação com partículas inertes, como veremos na sequência.

Para a determinação da presença de anticorpos, utilizam-se como antígeno proteínas imunogênicas (capazes de induzir resposta imunológica) que podem ser obtidas diretamente do patógeno, inativo ou não, ou por tecnologia de DNA recombinante.



## Exemplificando

As técnicas listadas abaixo são alguns exemplos daquelas que são utilizadas em kits diagnóstico:

- Precipitação de complexo formado entre anticorpo e antígeno, para identificação da presença do antígeno.
- A imunodifusão de uma substância solúvel em um meio fluido detecta o antígeno-anticorpo por meio de precipitação.
- A aglutinação forma agregados visíveis pela interação do anticorpo com alguma partícula antigênica.

- Hemaglutinação indireta é usada no diagnóstico de hepatite e hemofilia pela competição do sítio de ligação do anticorpo com antígeno fixado à hemácia ou solúvel;
- A presença de fator reumatoide é determinada por resultado positivo da aglutinação deste às partículas de látex utilizadas como suporte de adsorção.
- Proteína C reativa é encontrada no soro de pacientes com algumas doenças e detectada por aglutinação com partículas de látex que contêm anticorpos anti-proteína C reativa.
- A formação de flóculos no teste VDRL indica a presença de sífilis, pois o paciente produz anticorpos antilipídicos em resposta aos produtos produzidos pelas células infectadas, e esses anticorpos são detectados por cristais de colesterol sensibilizados com lecitina e cardiolipina.

Existe um kit de diagnóstico rápido da Aids que funciona com metodologia baseada no teste de Elisa.

Em um pente de 12 dentes, existem três áreas distintas que contêm, cada uma, anticorpo anti-imunoglobulina humana (para o controle da reação) e antígeno, e alguns kits podem apresentar mais de um antígeno na terceira área.

Os dentes do pente são colocados em recipiente que contém a amostra analisada.

Os anticorpos das amostras se ligam às anti-imunoglobulinas e formam um complexo.

O pente é colocado em outro recipiente que contém um conjugado de anti-imunoglobulina com enzimas que se ligam ao complexo formado na etapa anterior.

Em seguida, o pente é colocado em um terceiro recipiente que contém cromógeno e peróxido de hidrogênio. A presença dos anticorpos será revelada pela formação de círculos coloridos, na área do controle e nas áreas que contêm anticorpos.

Os resultados são interpretados conforme indicação do fabricante de acordo com a leitura das áreas de controle e antígenos, por exemplo: quando houver a formação de círculo colorido na área indicada para HIV-1 e na área de controle, resultado positivo para o teste.

Agora que sabe os detalhes de como é desenvolvida e produzida uma vacina, você já pode ajudar quem lhe perguntou por que não podemos trocar os vírus das vacinas por qualquer outra coisa que possa proteger da mesma forma.

A prevenção de doenças causadas por infecção de vírus e bactérias é feita pela aplicação de vacinas que são formuladas com os microrganismos inativos ou partes deles, que são considerados antígenos ao entrar no organismo humano, estimulando o sistema imunológico a produzir anticorpos específicos. É assim que o organismo aprende a codificar essas células de defesa e fica imune à infecção causada por aquele microrganismo específico. Há alguns casos em que essa memória imunológica é mais permanente, e outros em que mais de uma dose é necessária para fixar esta proteção. Algumas vacinas devem ser aplicadas em mais de uma dose no decorrer da vida.

Seria este o caso da dúvida da mulher grávida que quer saber por que ela deve tomar a vacina contra gripe neste ano se ela já tomou a vacina no ano passado.

O caso do vírus *influenza* da gripe é diferente. Neste caso, a vacina deve ser sempre "atualizada", pois o vírus possui uma taxa de mutação muito alta, o que o deixa diferente e muitas vezes irreconhecível pelo sistema imune que já foi vacinado na temporada anterior.

Por isso, há sempre uma produção de nova vacina a cada temporada, que é produzida com os vírus do outro hemisfério. Por exemplo, as vacinas a serem aplicadas no inverno brasileiro foram produzidas com amostras de vírus do final do inverno do hemisfério norte. Assim acontece uma verdadeira corrida de imunização que está constantemente dando a volta no globo, com o hemisfério sul usando os vírus do fim da temporada do hemisfério norte para se proteger, e vice-versa, enquanto o *influenza* continua mutando e tornando as vacinas anteriores menos eficientes.

### Aplicação de soro contra animais peçonhentos

#### Descrição da situação-problema

Adriano é um dos milhares de trabalhadores brasileiros empregados na produção de cana-de-açúcar. Trabalha diretamente nas plantações, atuando desde a etapa de plantio até a colheita do vegetal. Em um dia de pressa, esqueceu-se de tomar as devidas medidas de segurança e não usou perneira (protetor de pernas) ao entrar em uma das lavouras. Por infortúnio, foi mordido por uma cobra venenosa e logo começou a se sentir mal. Foi levado ao hospital, mas não conseguia se lembrar do tipo de cobra que o mordeu para informar ao médico. Como o médico pode escolher o soro a ser utilizado neste caso?

#### Resolução da situação-problema

Os soros, ao contrário das vacinas, são usados em casos emergenciais como o de Adriano, nos quais não há tempo para o sistema imunológico começar a produzir os anticorpos; logo, estes são fornecidos pelo próprio soro.

Para a produção do soro, são injetadas doses controladas do veneno, de cobra neste caso, em cavalos para que o organismo deles produza os anticorpos, que posteriormente serão isolados do plasma sanguíneo e utilizados como soro.

É muito importante saber informar ao médico o tipo de animal que mordeu a pessoa, mas nos casos em que não é possível essa informação, há soros que cobrem uma variedade de animais peçonhentos porque são produzidos a partir dos venenos de diferentes cobras. O que é injetado nos cavalos é composto por uma mistura de venenos; portanto, serão produzidos diferentes anticorpos específicos para cada um.

## Faça valer a pena

**1.** A vacina da gripe é distribuída gratuitamente pelo governo brasileiro para determinados grupos considerados de risco. O objetivo é prevenir surtos da doença entre a população.

Para formular uma vacina eficiente que cubra os diferentes tipos de vírus que podem existir a cada ano, a OMS realiza pesquisa semestral para conhecer esses novos vírus e considerá-los na fórmula da vacina. Sobre o processo de produção das vacinas da gripe, assinale a alternativa correta.

- a) Na formulação da vacina são adicionados vírus ativos, que provocam infecção, que vai incentivar a produção de anticorpos pelo sistema imunológico humano.
- b) Como os vírus dependem de célula viva para se reproduzir, são injetados em cavalos para a produção da vacina contra a influenza.
- c) As principais formas/tipos do vírus atenuado são identificadas e utilizadas na produção da vacina.
- d) As vacinas desenvolvidas para os vírus tipo A são igualmente eficientes na prevenção da infecção pelos vírus tipos B e C.
- e) A pessoa que se vacinou contra a gripe em um ano está dispensada da vacinação no ano seguinte.

**2.** Os soros são bastante conhecidos no tratamento de pessoas mordidas por animais peçonhentos, como cobras, aranhas e escorpiões.

Sobre a composição dos soros e suas diferenças em relação às vacinas, marque a opção correta.

- a) Os soros, assim como as vacinas, são utilizados na prevenção de doenças.
- b) Os soros são formados por anticorpos, enquanto as vacinas por antígenos.
- c) Os soros são produzidos pelo uso de vírus e bactérias com atividade atenuada.
- d) No caso da hepatite B, o uso de soro é o tratamento indicado.
- e) O soro antiofídico é produzido em cavalos porque esses animais naturalmente já possuem anticorpos contra veneno de cobras.

**3.** A biotecnologia apresenta aplicações na produção de vacinas e soros para prevenir e tratar doenças, como também no desenvolvimento de kits/ análises responsáveis por diagnosticá-las.

Os kits biológicos permitiram o desenvolvimento de análise rápida usada no diagnóstico da Aids. Sobre as técnicas que são aplicadas como análise de identificação de doenças, assinale a alternativa correta.

- a) O sequenciamento do DNA do patógeno é técnica utilizada nos kits de diagnóstico rápido.
- b) O vírus da Aids não é possível de ser identificado em kits de diagnóstico porque sofre muitas mutações.

- c) Os kits diagnóstico sempre são formulados com anticorpo que pode formar complexo com o antígeno a ser identificado.
- d) A técnica de aglutinação é utilizada em kits para diagnóstico de Aids pela formação de complexo entre antígeno pertencente ao teste e anticorpo da amostra.
- e) A identificação de proteína C reativa pode ser muito precisa no diagnóstico de uma doença porque indica a presença de inflamação.

## Seção 4.2

### Terapia gênica

#### Diálogo aberto

Mariana tem um filho de dois anos que aparentemente está com sintomas de gripe. Ela o leva ao médico e informa que o menino foi vacinado regularmente contra a gripe, porém o diagnóstico médico confirma a infecção do garoto por um vírus da doença. Então, o médico solicita uma série de exames para identificar o tipo de vírus e demais condições do organismo da criança a fim de determinar o porquê de não ter respondido bem à infecção mesmo tendo sido vacinada corretamente. Os resultados dos exames mostram que a criança tem um sério problema de imunidade, por isso está suscetível a contrair o vírus da gripe mesmo tendo sido vacinada, pois seu organismo não aprendeu a sintetizar células de defesa contra os vírus atenuados da vacina. Que tipo de tratamento pode ser considerado pelo médico e por Mariana para curar o garoto desta doença?

#### Não pode faltar

##### Conceito e histórico da terapia gênica

Ao longo de todo o nosso material sempre estudamos assuntos atuais, ou mesmo aqueles que já são conhecidos e foram estudados há algum tempo, como a estrutura da molécula de DNA, mas geraram conhecimento aplicado que permite o desenvolvimento de tratamentos até os dias atuais.

Agora imagine que, através das tecnologias que já aprendemos, possamos inserir genes em células e tecidos de um indivíduo para o tratamento de doenças.

É disso que trata a terapia gênica, que utiliza a tecnologia da engenharia genética para tratar, principalmente, as doenças hereditárias, ou seja, aquelas que têm origem genética e são transmitidas de pais para filhos.



Note a diferença entre a terapia gênica e a aplicação da tecnologia do DNA recombinante para a produção de determinadas proteínas.

Como já vimos, células como da *E. coli* podem receber o gene humano produtor de insulina e passar a expressá-lo produzindo essa proteína, que, por sua vez, será utilizada no tratamento de pacientes diabéticos. Na terapia gênica, células do organismo humano recebem gene para substituir aquele causador da doença. Então, não se trata de produzir proteína que atuará como um biofármaco para um paciente com determinada doença, mas de corrigir o problema genético que a causa.

Poderíamos dizer que a terapia gênica é profilática, enquanto a produção de proteínas por DNA recombinante é o tratamento.

O estudo e as experimentações da terapia gênica iniciaram-se na década de 1980 com os avanços que os conhecimentos de biologia molecular permitiram. Porém, a primeira aplicação humana só aconteceu no ano de 1990, por questões que veremos mais adiante.

E foi nesse ano que o National Institute of Health (Instituto Nacional de Saúde), dos EUA, realizou a primeira terapia gênica autorizada em uma criança de 4 anos que apresentava uma doença genética denominada imunodeficiência combinada grave, que torna o paciente suscetível ao desenvolvimento de infecções por contato com qualquer tipo de microrganismo.

Esse é um tipo de doença que não permitiria à criança uma vida normal, e até mesmo seria difícil chegar à vida adulta, concorda? Ela deveria viver isolada em uma bolha de plástico estéril.

Através da terapia gênica, os médicos recolheram glóbulos brancos do corpo da criança e nestes introduziram o gene que faltava para fortalecer o sistema imunológico dela.

Depois de as células terem sido cultivadas (aumentado em quantidade), foram reintroduzidas na corrente sanguínea da paciente e os resultados foram positivos, ou seja, o objetivo de fortalecer o sistema imunológico foi atingido.

Apesar de todas as limitações da época e de ser a primeira aplicação em humanos, a paciente se manteve estável por alguns meses, mas teve de passar pelo procedimento mais vezes.

Justamente para chegar a um modelo ideal de aplicação desses genes, as pesquisas com terapia gênica não param.

O próximo passo é introduzir os genes diretamente nas células humanas quando elas não puderem ser removidas do organismo, como foi feito com os glóbulos brancos.

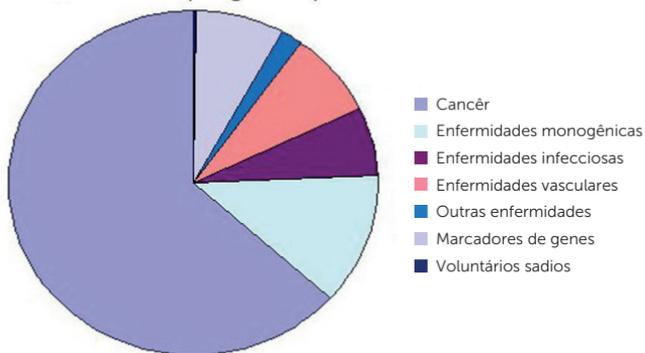
Aí o desafio se torna muito maior, pois os cientistas vão se deparar com todas as consequências de se introduzir em uma célula um fragmento grande de DNA, que pode, muitas vezes, carregar mais informações do que as já conhecidas, bem como a dificuldade de posicionamento no lugar certo do genoma.

Mas, por outro lado, os resultados permitiriam o tratamento de doenças como a fibrose cística, hemofilia e distrofia muscular.

Veja na Figura 4.2 a distribuição dos estudos e das aplicações da terapia gênica por tipo de enfermidades.

Figura 4.2 | Proporção do uso da terapia gênica por diferentes enfermidades

### Ensaio de terapia gênica por enfermidade



Fonte: <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/af/Porenfermedades.jpg>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

### Principais modalidades e vetores da terapia gênica

Tendo compreendido o conceito da terapia gênica, devemos entender também como ela funciona no tratamento de doenças genéticas por meio da inserção de um gene "saudável" em substituição ao gene "doente" no genoma, que passará a fazer parte das células de determinados tecidos do organismo, ou pelo silenciamento (controle da expressão gênica) do gene causador da doença.

Para realizar essa substituição ou reparo de genes, existem diversos e diferentes métodos.



### Exemplificando

Métodos de substituição e reparo de genes utilizados em terapia gênica:

1. O gene saudável pode ser inserido em qualquer região do genoma para substituir o gene problemático.
2. O gene doente pode ser trocado por um gene normal por meio de recombinação (mistura entre os genes durante a meiose).
3. O gene doente pode ser reparado por meio de mutação reversa seletiva (troca de base nitrogenada que altera o aminoácido codificado), que devolve ao gene suas funções normais.
4. O grau de expressão de determinado gene pode ser controlado (como vimos na Unidade 1).

Perceba que os dois primeiros exemplos são fiéis à definição da terapia gênica, utilizando técnicas de inserção de genes saudáveis no genoma, em substituição ao gene que causa a doença. Os dois últimos promovem o tratamento da doença em nível gênico por técnicas de engenharia genética, que pode ocorrer pela inserção de oligonucleotídeos, que vão hibridar (parear) com os genes de interesse e alterar sua transcrição ou tradução.

Agora, você deve estar se perguntando: com base nas diversas técnicas que já estudamos, como o gene de interesse pode ser inserido no genoma humano?

O conhecimento dos microrganismos permitiu aos cientistas acompanhar a evolução de vírus que são capazes de encapsular e transportar seus genes para células humanas, e por isso eles causam doenças.

Usando essa capacidade para o lado positivo, os pesquisadores manipularam o genoma dos vírus removendo seus genes causadores de doenças e inserindo o(s) gene(s) terapêutico(s).

Agora, o vírus pode infectar o paciente de terapia gênica e inserir seus genes no genoma humano. Ao final, espera-se que

as células teciduais que contêm o gene terapêutico repliquem e permaneçam no tecido.

A este vírus transmissor do gene terapêutico dá-se o nome de vetor.

Neste caso, os vírus de uso mais comuns são: Adenovírus, Lentivírus e Adenoassociados, utilizados como vetores virais no tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, câncer e doenças monogênicas.

O fluxo de técnicas se inicia com a adição do gene terapêutico em um plasmídeo, que, por sua vez, será inserido no genoma do vetor (que é um vírus modificado geneticamente para não causar doenças) e, por tecnologia de DNA recombinante, passará a fazer parte do material genético viral. Este novo DNA do vetor (DNA viral modificado + gene terapêutico) é inserido em células que vão produzir estes vetores. Depois de produzidos e purificados, os vetores serão utilizados nas células humanas que precisam ser tratadas e, pela capacidade que os vírus têm de adicionar seu DNA ao DNA do hospedeiro, ocorre a inserção no genoma humano, que passará a ser transcrito em mRNA com posterior tradução das proteínas terapêuticas.



### Exemplificando

Não só os vírus (Lentivírus, Adenovírus, Adenoassociados) são utilizados como vetores de genes terapêuticos para as células humanas, mas existem também métodos não virais, como o DNA despido (injeção intramuscular de DNA plasmídico), que podem atuar como oligodesoxinucleotídeos (pequenos trechos complementares ao trecho de interesse que hibridizam com o gene defeituoso, impedindo sua transcrição) e ser injetados junto com lipoplexos e poliplexos (moléculas que protegem o DNA despido), e os métodos híbridos (combinam as duas técnicas, viral e não viral).

## Técnicas e aplicações atuais da terapia gênica

A grande maioria dos estudos atuais de terapia gênica é voltada aos tratamentos de câncer.

Não é para menos, uma doença com alta taxa de mortalidade e com a dificuldade de ser potencialmente poligênica, ou seja, causada

por vários genes, o que dificulta o direcionamento da terapia. Porém, os maiores avanços também são obtidos nessa área.

Em 2006, um estudo tratou com sucesso um melanoma metastático (forma grave de câncer de pele) em dois pacientes a partir da reprogramação genética de células saudáveis que passaram a atacar as células cancerígenas (MORGAN et al., 2006).

No mesmo ano, grande avanço foi conseguido quando cientistas desenvolveram uma maneira de impedir que o sistema imune do paciente a receber a terapia gênica rejeite o gene inserido (CROSS et al., 2006). Foram identificados genes controlados por microRNA (trechos de RNA reguladores da expressão gênica) e o uso desta molécula permitiu regular seletivamente a identidade do gene terapêutico, permitindo sua expressão em preferência ao gene doente. Testado com sucesso em cobaias, permitiu a evolução das aplicações da terapia gênica.

A terapia gênica também foi utilizada para promover a cura ou amenizar os sintomas da doença de Huntington, distúrbio neurológico hereditário que causa movimentos corporais anormais e falta de coordenação, que também afeta habilidades mentais e personalidade. Neste caso, a técnica se baseia no fato de pequenas moléculas de siRNA (fragmentos de RNA com 23 pares de nucleotídeos) degradarem um mRNA específico. Assim, um siRNA pode ser programado para se ligar ao produto da transcrição de um gene que causa a doença e, ao degradar a molécula de mRNA, impede sua expressão.

Ou ainda pode ser feito o reparo do mRNA transcrito a partir de genes doentes, tornando o produto da expressão normal. Essa técnica pode ser aplicada em tratamentos de fibrose cística e em alguns tipos de câncer (BACHOUD-LÉVI et al., 2004).

Em 2013, a revista *Isto É* publicou notícia sobre a autorização na Europa do primeiro medicamento para terapia gênica como o marco da medicina moderna.

O Glybera é usado no tratamento de doença genética rara em que a pessoa não produz a enzima lipase, responsável pela digestão de gordura. Até então, o tratamento era realizado por restrição de dieta para evitar os problemas da indigestão do nutriente, como, por exemplo, pancreatite (inflamação do pâncreas).

O remédio troca o gene defeituoso por um gene saudável utilizando o vírus adenoassociado como vetor e corrige o problema.

A primeira aplicação da terapia gênica que também comentamos aqui, no tratamento da síndrome de imunodeficiência combinada, chegou a uma droga após 11 anos de estudo e só aguarda a liberação de agências reguladoras para vender o medicamento na Itália; os pesquisadores apontam a terapia como a única solução para a doença (BLAESE et al., 1995).

A reportagem ainda cita outro experimento realizado nos EUA, os cientistas injetaram no cérebro de 65 pacientes com doença de Parkinson uma solução contendo um gene que determina a produção de uma proteína cuja ausência pode ocasionar sintomas da doença. Os doentes que receberam a injeção apresentaram melhora de 23% nos sintomas. Já os que receberam placebo, 12% (DURING et al., 2001).

Nos estudos da cura da Aids, os avanços foram conseguidos a partir da modificação genética dos linfócitos T (células de defesa invadidas pelo vírus do HIV) que as tornou resistentes à entrada do vírus. Ao mesmo tempo, mais uma pesquisa injetou uma solução de genes responsáveis pela produção de anticorpos contra o HIV e impediu por completo a contaminação de animais pelo vírus (MITSUYASU et al., 2009).

No tratamento da diabetes tipo 1 (hereditária) e diabetes tipo 2 (adquirida), os resultados da aplicação da terapia gênica também são promissores, curando totalmente ratos que apresentavam a doença (KOJIMA et al., 2003).

No Brasil, pesquisadores da Unicamp têm testado a terapia em pacientes com hemofilia B grave, incapazes de coagular o sangue por não produzirem o fator de coagulação IX. A estratégia é inserir genes vinculados à produção do fator IX (OLIVEIRA, 2016).

Na área da cardiologia, há estudos com uma vacina de genes capazes de levar o sistema imunológico a atacar as placas de gordura oxidadas nas artérias (TILEMANN et al., 2013).



### Pesquise mais

Veja a expectativa para a chegada ao Brasil da terapia gênica no tratamento de câncer, por Carolina Dantas e Monique Oliveira ao Portal G1, disponível em: <<https://g1.globo.com/bemestar/noticia/terapia-genetica-para-o-cancer-deve-chegar-ao-brasil-em-2018.ghhtml>>, acesso em: 18 dez. 2017.

## Células-tronco, sua utilização e potencial terapêutico

Muito se ouve falar sobre células-tronco e seu potencial no tratamento e cura de doenças.

Isso se deve ao fato de não serem células especializadas e com capacidade de diferenciação em muitos tipos de células, podendo ser, inclusive, programadas para desenvolver funções específicas.

Elas passam por replicação, originando outras células-tronco ou, dependendo da necessidade, se transformam em outros tipos de células especializadas.

Desde o ano de 2007, os cientistas contam com três tipos dessas células: aquelas de origem embrionária, encontradas no cordão umbilical e na massa celular interna do blastocisto (4 a 5 dias após a fecundação); adultas, presentes na medula óssea; e as chamadas pluripotentes induzidas, obtidas em laboratório a partir de células da pele pela reprogramação induzida por inserção de 4 genes através de um vetor (vírus).



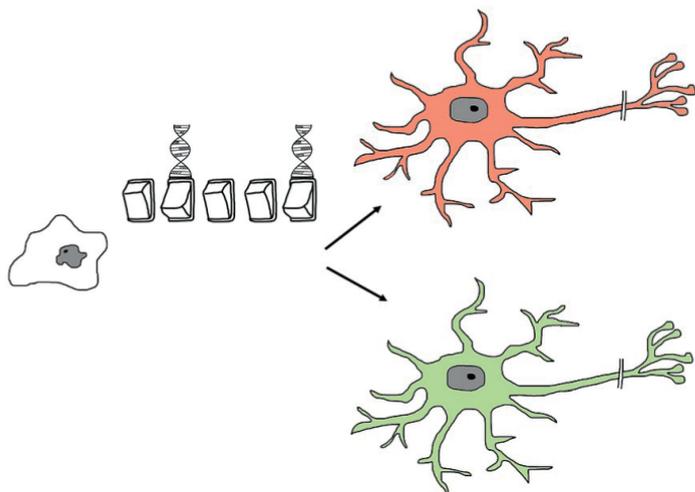
### Assimile

Independentemente do seu tipo, qualquer uma dessas três classificações de células-tronco apresenta as características que comentamos acima:

- Não são especializadas em uma função tecidual.
- Capacidade de diferenciação em muitos tipos de células.

A figura a seguir mostra o esquema de diferenciação das células-tronco como um interruptor que pode ligar ou desligar a necessidade de diferenciação e, através das características do meio, induzir a formação de células com diferentes especialidades, mostradas em cores diferentes.

Figura 4.3 | Indução da diferenciação de células-tronco



Fonte: <<https://pixabay.com/pt/c%C3%A9lulas-tronco-diferencia%C3%A7%C3%A3o-2371611/>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

Como consequência dessas propriedades, as células-tronco são importantes nas pesquisas sobre doenças e tratamentos, pois permitem aos pesquisadores modelar as doenças, testar medicamentos e terapias, além da informação essencial de como funcionam e se desenvolvem os tecidos do nosso corpo até a vida adulta.

Além disso, as células-tronco são promissoras no tratamento de doenças pela possibilidade de trocar células doentes por células saudáveis. Em tese, qualquer doença que cause degeneração dos tecidos do organismo pode ser tratada por terapia celular.

O tratamento da leucemia pelo uso de células-tronco é bastante conhecido e divulgado em campanhas de doação de medula óssea.

Estas células podem ser de origem embrionária, neste caso do cordão umbilical, ou da medula óssea de um doador adulto. São inseridas no corpo do paciente através da infusão venosa e desempenham o papel que as células doentes já não cumprem, o que não exclui a necessidade de quimioterapia para causar a morte das células tumorais.

A médica responsável pelo Banco de Cordão Umbilical do Brasil, Adriana Homem, afirma que

o resultado das terapias com células-tronco do cordão umbilical tem se mostrado muito promissor, portanto podemos dizer que é uma das melhores formas de tratamento para a leucemia e, no Brasil, cinco pessoas que armazenaram as células-tronco do seu bebê já precisaram usá-las e o resultado foi ótimo (BCU, 2013).



Reflita

Outros profissionais, no entanto, são contra o armazenamento das células-tronco, pois alegam que o material retirado do cordão umbilical já pode conter traços da doença.

Qual é a sua opinião?

Além disso, são necessários muitos testes para garantir a segurança e a eficácia dos tratamentos usando células-tronco, para proporcionar as condições ideais que permitam a elas se transformarem em células específicas necessárias a cada tipo de tratamento. Também é necessário otimizar um sistema que entregue estas células às partes específicas do corpo em que elas devem atuar, estimulando seu funcionamento e integração com as células naturais do corpo.

### **Bioética em Biotecnologia**

Não só nessa seção de ensino, mas em todo o nosso material didático, falamos de alteração de código genético para a produção de características de interesse.

Quando pensamos em terapia gênica e na edição do genoma humano para o tratamento de doenças, o que você pensaria se fosse um religioso fervoroso que acredita que somente Deus pode ter esse tipo de intervenção na vida humana? Ou um geneticista que luta incansavelmente pela manutenção da diversidade entre os indivíduos e concorda com a lei da seleção natural, que diz que somente os organismos mais adaptados sobrevivem? Ou ainda um médico que enxerga além dos benefícios da terapia gênica e também prevê o lado maléfico, como a possibilidade de gerar um

tumor caso o gene substitua um supressor tumoral? Por fim, como você encararia a possibilidade de utilizar a terapia gênica em você mesmo ou em seus familiares?

As questões levantadas são perturbadoras não só em nosso íntimo, mas em toda sociedade envolvida com terapia gênica.

Por isso, não podemos desenvolver nosso estudo em Biotecnologia sem entender que todas as técnicas, processos, pesquisas e tratamentos realizados, principalmente em seres humanos, seguem uma bioética.

A Bioética é uma ciência interdisciplinar que estuda as condições necessárias para a administração responsável da vida humana, animal e ambiental. Confere sentido aos estudos relacionados à vida e à saúde.

Então, quando falamos em editar o código genético de uma pessoa para o tratamento de uma doença, tudo deve ser feito de forma responsável, que respeite a vida e a liberdade da pessoa, embasado em princípios morais e em valores dos seres humanos.

Em Biotecnologia, é necessário se delimitar até onde a ciência pode avançar com estes estudos, já que estamos falando da manipulação de células vivas e, algumas vezes, de seres (animais, vegetais) vivos.

Reflita mais um pouco sobre o caso da clonagem. Quantas pessoas indagariam: o homem virou Deus?

E a reprodução assistida? Consagrada pela fertilização *in vitro*, sempre enfrenta uma série de problemas na área de Direito. Conflito entre o desejo de conceber um filho, resguardo da identidade de doadores de sêmen, respeito pela vida embrionária e identidade genética da criança.

Isso nos mostra que nada pode ser feito sem uma justificativa plausível e sem preservar a integridade das espécies.

Os objetivos devem ser bons, e o caminho percorrido para atingi-los também.

Assim, o principal papel dessa nova ciência é discutir e refletir sobre questões conflituosas, de forma que as pessoas possam conviver com opiniões e respostas diferentes para os problemas, mas que respeitem a maneira de pensar e decisão do outro, para que convivam de forma pacífica mesmo em um ambiente de contradições.



Assista ao vídeo “Terapia Gênica”, disponível em <<https://www.youtube.com/watch?v=2D46hZxcliY>>, acesso em 18 dez. 2017, que resume os conteúdos que estudamos nesta seção.

O artigo científico *Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será* (LINDEN, 2010), disponível no link <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-40142010000300004&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-40142010000300004&script=sci_arttext&tlng=pt)>, acesso em 26 jan. 2018, também pode auxiliar no melhor entendimento desta terapia.

## Sem medo de errar

O caso da baixa imunidade do filho de Mariana é um exemplo de doença genética.

O menino não apresenta em seu genoma genes que carregam informação para codificar certas células de defesa.

Essa pode ser apenas a primeira infecção do garoto, pois, com um sistema imunológico debilitado, ele está suscetível a contrair infecções pelo contato com outros tipos de microrganismos. Logo, não é uma doença simples.

Mas agora você já conhece a terapia gênica e sabe que ela é indicada para os casos de doenças genéticas.

Uma possível solução para o tratamento do menino seria realizar a reprogramação de suas células inserindo em um vetor (vírus) o(s) gene(s) que carrega(m) informação para a tradução de proteínas nas células de defesa. Estes vetores são introduzidos na corrente sanguínea do garoto e, pela capacidade que têm de adicionar seu DNA ao genoma humano, promovem a inserção dos genes desejados ao genoma do filho de Mariana.

Se forem inseridos em células adultas, pode existir a necessidade de repetir o tratamento por mais vezes, já que estas células podem morrer sem transmitir os novos genes às novas células. Porém, o tratamento pode ser direcionado às células-tronco, por exemplo, que ainda passarão por processo de replicação, e dessa forma propagarão o novo genoma, que agora contém informação para produzir as células de defesa, e assim o filho de Mariana estará livre dos sintomas/consequências da doença.

### Uso de células-tronco no tratamento de leucemia

#### Descrição da situação-problema

Daniel tem 26 anos e foi diagnosticado com leucemia, um tipo de câncer que afeta as células sanguíneas. Começou a quimioterapia para combater as células cancerígenas e foi orientado a se cadastrar em bancos de medula óssea para buscar um doador compatível que possibilite a cura da doença. Depois de 1 ano nessa busca por um doador e sem resultados positivos, ele se sente desanimado. Existe outra possibilidade para Daniel conseguir a infusão de células-tronco que se diferenciariam para substituir as células doentes do seu sangue?

#### Resolução da situação-problema

Existem três outras possibilidades para Daniel.

Caso a mãe dele tivesse guardado células-tronco do cordão umbilical em um banco de células-tronco, estas poderiam ser usadas. Outra opção seria ela engravidar novamente para extrair do cordão umbilical essas células, ou mesmo células da medula deste irmão, que também devem passar pela avaliação de compatibilidade com Daniel.

Outra opção, ainda em desenvolvimento, seria recorrer à produção laboratorial de células-tronco, pluripotentes induzidas, que seriam produzidas a partir de células da pele do próprio Daniel, minimizando o problema da compatibilidade.

Estas células possuem capacidade de diferenciação e especialização em qualquer tipo de célula do nosso corpo e podem substituir as células doentes do sangue de Daniel.

## Faça valer a pena

**1.** A terapia gênica é uma moderna técnica de biotecnologia usada pela medicina no tratamento de doenças genéticas e que promete curas reais de doenças graves.

Abaixo são apresentados exemplos de tratamentos de doenças. Assinale a alternativa que utiliza terapia gênica.

- a) Uso de quimioterapia no tratamento de diversos tipos de câncer.
- b) Administração de vitamina C como prevenção de problemas de imunidade.
- c) Injeção no cérebro de pacientes com Parkinson de uma solução de gene que ameniza os sintomas da doença.
- d) Aplicação da tecnologia do DNA recombinante para produzir proteína deficiente no organismo humano doente em seres unicelulares, para posterior administração como biofármaco.
- e) Consumo do biofármaco lactase para o tratamento dos sintomas da intolerância à lactose.

**2.** A terapia gênica necessita do uso de um vetor para inserir o gene saudável que substituirá o gene doente no genoma da pessoa portadora de uma doença genética.

Normalmente são usados vírus como vetor. Por quê?

- a) Devido à alta capacidade mutagênica que os vírus apresentam.
- b) Pela capacidade que os vírus têm de adicionar seu material genético (DNA) ao DNA do hospedeiro.
- c) Porque alguns vírus não são patogênicos e não causam infecções quando usados como vetores.
- d) Porque os vírus são seres unicelulares.
- e) Pelo fato de os vírus se multiplicarem mais rapidamente que bactérias e leveduras.

**3.** As células-tronco são assunto atual, no qual a sociedade e a medicina depositam grandes expectativas no tratamento de doenças.

Identifique a alternativa que apresenta a característica das células-tronco que permite o seu uso no tratamento de doenças.

- a) São células obtidas do próprio organismo do paciente, o que evita rejeição.
- b) São células livres do gene doente.
- c) São células obtidas apenas de blastocisto, por isso ainda não são especializadas.
- d) Apresentam capacidade de autorregeneração de partes danificadas do DNA.
- e) Capacidade de se autorreplicar e se diferenciar em vários tipos de células especializadas.

## Seção 4.3

### Genética forense

#### Diálogo aberto

Após os médicos terem tentado a vacina no filho de Mariana sem obter sucesso e terem apresentado a ela a possibilidade da terapia gênica, a mãe decide aceitar o tratamento na expectativa de curar o filho. Agora, o material genético do menino será enviado para o laboratório para que seja identificado o gene e/ou região genômica associada a esta imunodeficiência. No pedido médico recebido pelo bioquímico do laboratório, não estava especificada a análise a ser feita, então ficou a cargo do conhecimento do profissional responsável. Se fosse você este bioquímico, qual análise genética faria e por quê?

#### Não pode faltar

##### **Marcadores moleculares: análise da variabilidade genética por meio de RFLP**

Nos estudos, análises e testes que envolvem o conhecimento ou a identificação do DNA em prol da justiça, que dão nome à Genética Forense, é importante conhecer regiões genômicas específicas que permitam a identificação do indivíduo.

A variabilidade genética entre indivíduos é a característica utilizada na identificação e separação entre eles.

Esta variabilidade genética se refere às possíveis diferenças entre alelos de um mesmo gene dentro de uma população.

Após a conclusão do Projeto Genoma Humano, tomou-se conhecimento de que 99% dos genomas dos seres humanos são iguais, e a variabilidade entre os indivíduos é determinada pelo 1% restante.

Às mutações que dão origem a essa variabilidade, dá-se o nome de polimorfismo.



A variabilidade genética mede a probabilidade de ocorrência de diferentes alelos para um mesmo gene, enquanto o termo diversidade genética, muito utilizado por geneticistas e biólogos (preocupados em manter a diversidade genética), refere-se à quantidade total de variações genéticas entre indivíduos de uma população ou até mesmo entre populações de uma mesma espécie.

Determinar essas variações permite a identificação de indivíduos, por exemplo, em uma cena de crime, pois atuam como marcadores genéticos.

Para entendermos como isso pode ser feito, vamos pensar na seguinte situação: uma joalheria é assaltada e durante as investigações são encontrados fios de cabelo; pela cor, suspeita-se que sejam do assaltante, e não dos funcionários da loja. O DNA do indivíduo pode ser extraído do bulbo capilar e analisado conforme técnicas que já aprendemos, auxiliando na identificação do suspeito. Algumas pessoas que frequentaram a loja nos últimos dias e não compraram nenhum produto foram apontadas como suspeitas e tiveram seu material genético comparado ao do fio de cabelo, até que apenas uma pessoa apresentou material compatível com o do DNA analisado e foi responsabilizada pelo assalto.

Como essa identificação foi possível?

Nós já aprendemos algumas técnicas de manipulação do DNA, inclusive os testes de sequenciamento e PCR que seriam úteis nesse tipo de trabalho da Genética Forense.

Porém, são análises mais demoradas e mais caras, por isso perdem quando comparadas àquelas que se apresentam eficientes e que disponibilizam resultados em menor tempo e por menor custo.

A identificação da variabilidade genética por técnica de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism* – polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição) apresenta essas características e pode ser usada para este fim.

Nesta técnica, são formados fragmentos de DNA, por enzimas de restrição, que são separados por eletroforese em gel de agarose e identificados por raios X.

As enzimas de restrição são específicas para diferentes ligações nucleotídicas e vão formar fragmentos de DNA com diferentes tamanhos.

Na separação em gel, mesmo existindo cargas, os fragmentos menores migrarão mais rápido, o que permite que eles sejam separados e visualizados em forma de bandas.

Cada indivíduo apresenta seu padrão de fragmentos, chamado “perfil de digestão”, detectado pelo número e padrão dos fragmentos gerados e usado para sua identificação, por comparação com o perfil do DNA encontrado na cena do crime.

### **Análise da variabilidade: minissatélites, microsatélites e RAPD**

Outras técnicas são empregadas com o objetivo de identificar a variabilidade entre indivíduos ou de usar essa variabilidade para identificar indivíduos e espécies.

Para isso podemos, por exemplo, aplicar uma análise de minissatélites.

Os minissatélites são sequências de 6 a 100 nucleotídeos repetidos e enfileirados de DNA (JEFFREYS et al., 1985).

Esses pequenos fragmentos de DNA também são formados por aplicação de enzimas de restrição, mas em vez de serem avaliados por eletroforese, como o RFLP, são analisados por PCR, que permite maior agilidade nos resultados quando comparado ao primeiro.

A identificação da variabilidade ou da identidade é possível porque as repetições presentes estão conservadas no genoma de uma mesma espécie, diferenciando-as.



### **Exemplificando**

Com base nesse conhecimento, é possível identificar com certeza a espécie de ossos encontrados enterrados, como podemos ver na seguinte reportagem disponível no link <<https://tarobanews.com/noticias/policial/iml-confirma-que-ossos-enterrados-na-zona-norte-sao-humanos-e0nVg.html>>, acesso em 2 jan. 2018.

Outra análise, a de microsatélites, foi bastante utilizada nessas investigações baseadas em variabilidade genética.

Os microsatélites são repetições (menores que os minissatélites, de 1 a 6 pb) de pares de bases de DNA – AT e CG – utilizadas como marcador genético em estudos de parentesco, identificação humana

e migrações humanas. São usados porque: são muito frequentes e distribuídos ao acaso, apresentando boa cobertura do genoma; podem ser amplificados individualmente por PCR e apresentam comportamento codominante (os heterozigotos podem ser identificados); como são altamente repetitivos e de pequena extensão, apresentam alto grau de polimorfismo (capacidade de assumir diferentes formas, permitindo o surgimento de novos alelos).

O Quadro 4.2 mostra as ilhas ou unidades repetitivas possíveis de ser encontradas nos marcadores tipo microsatélite.

Quadro 4.2 | Unidades de repetição dos microsatélites

Tipo	Unidade de repetição
Mononucleotídica	G(n)
Dinucleotídica	GA(n)
Trinucleotídica	GAT(n)
Tetranucleotídica	GATA(n)
Pentanucleotídica	GATAC(n)
Hexanucleotídica	GATACA(n)

(n) – quantidade de repetições

Fonte: elaborado pela autora.

Por essas características, a técnica pode ser aplicada tanto na identificação da ossada humana, como vimos no exemplo, como em testes de paternidade/maternidade, pela identificação dos pb repetidos herdados pelo filho.

A metodologia que utiliza marcadores do tipo RAPD (do inglês Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) apresenta essas mesmas aplicações que vimos para os mini e microsatélites.

É uma variação do PCR que utiliza um único *primer* em vez de um par de *primers*, que contém uma sequência arbitrária que vai direcionar a reação de amplificação de uma sequência-alvo desconhecida, complementar a ele. Como grande quantidade de DNA é produzida, esse fragmento de DNA pode ser visto como uma banda em gel de eletroforese. Cada *primer* direciona a síntese de vários segmentos de DNA ao mesmo tempo em vários pontos do genoma, o que gera um perfil de bandas no gel. Imagine que,

na cena de um crime, foi encontrado material que permitiu a extração de DNA. *Primers* de marcadores genéticos aleatórios são desenhados e usados para identificar sequências nucleotídicas complementares a eles no DNA do criminoso (presente na cena do crime) contra DNAs de pessoas suspeitas. A pessoa que apresentar um perfil de bandas no gel de eletroforese semelhante ao perfil do DNA encontrado na cena do crime poderá ser responsabilizada.

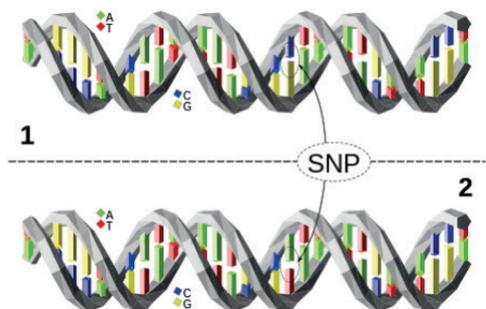
### **Análise da variabilidade: polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e genotipagem**

Dos marcadores moleculares, a avaliação de polimorfismo de um único nucleotídeo se tornou uma das ferramentas mais utilizadas atualmente. Em muitas análises, substituiu os marcadores que comentamos anteriormente pela eficiência, rapidez e custo relativamente baixo.

O polimorfismo de nucleotídeo único, abreviado como SNP (do inglês *single nucleotide polymorphism*), corresponde à troca de uma base nitrogenada, que pode ser associada diretamente a uma característica expressa, ou estar próxima à região codificante dessa característica ou ainda diferenciar e identificar indivíduos, como nas aplicações da genética forense.

A Figura 4.4 apresenta a estrutura molecular de um SNP.

Figura 4.4 | Identificação de um polimorfismo de nucleotídeo único, SNP



Fonte: <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2e/Dna-SNP.svg>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

Perceba que, da fita 1 de DNA para a fita 2, ocorre a mudança de um par de bases nitrogenadas, representadas por colorações diferentes, mas que poderiam representar, por exemplo, a troca de uma G (guanina) por uma T (timina).

A partir do trabalho de empresas privadas e instituições de pesquisa, foram criados chips que contêm sondas (sequências de nucleotídeos presentes no genoma de determinada espécie, que hibridizam com os fragmentos de DNA em análise) para identificar milhares de SNPs ao mesmo tempo.



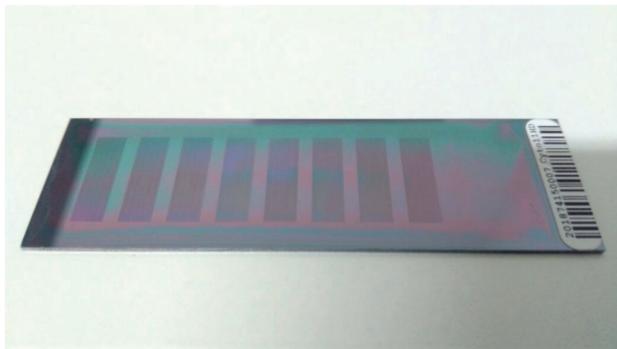
Pesquise mais

A empresa Illumina tem desenvolvido diversos *chips* que apresentam milhares de SNPs distribuídos entre os 23 cromossomos autossômicos humanos. Um deles, o Infinium Core-24kit, apresenta mais de 300 mil marcadores e permite a análise simultânea de 24 amostras, o que reduz o custo de análise de cada amostra e apresenta boa cobertura no genoma humano. Em vez de avaliar uma única ou poucas regiões por microssatélite, por exemplo, são avaliadas 300 mil regiões a cada 10000pb, uma vez que o genoma humano é formado por 3 bilhões de pb.

Esse fato também torna menor o custo de análise por SNP.

Outros *chips* ainda garantem maior cobertura e análise de diferentes quantidades de amostras. Tudo depende dos objetivos.

Figura 4.5 | SNP *chip* humano com 850 mil marcadores



Fonte: do acervo da autora.

A leitura simultânea de todos esses marcadores ocorre em aparelho específico, como no da Illumina, MiSeq System, apresentado na Figura 4.5, e a essa análise dá-se o nome de genotipagem.

Figura 4.6 | Equipamento MiSeq Illumina utilizado em genotipagem



Fonte: <[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Illumina\\_MiSeq\\_sequencer.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Illumina_MiSeq_sequencer.jpg)>. Acesso em: 5 jan. 2018.

Como os resultados da genotipagem são dados como loci bialélicos, AA e BB para os homocigotos e AB para os heterocigotos, em extensas planilhas (imagine resultados de 300 mil regiões!) devem ser avaliados por técnicas de bioinformática para permitir a comparação de diversas amostras e chegar a conclusões sobre similaridade ou não.

### **Testes de paternidade e criminalística: aplicações, princípio, técnicas, interpretação dos resultados e missão de laudos**

Dentro da Genética Forense, a justiça ainda lança mão de testes genéticos para a determinação de vínculos biológicos entre indivíduos, utilizados na investigação de paternidade, como também na identificação de suspeitos em caso de violência sexual, de cadáveres carbonizados ou em decomposição, partes de corpos mutilados, peças ósseas e órgãos humanos e produção de perfis de material genético a partir de evidências encontradas em locais de crimes (manchas de sangue, pelos, esperma, etc.).

Isso é possível porque a molécula de DNA apresenta grande estabilidade; mesmo em condições de corpos em decomposição ou carbonizados, a molécula ainda apresenta sua estrutura linear e carrega as informações genéticas do indivíduo.

Estes testes baseiam-se na busca por marcadores genéticos, que são as variações na sequência do DNA que diferem um indivíduo do outro, tendo os polimorfismos de microssatélites como os mais utilizados em testes de DNA e aceitos pelos órgãos oficiais, sendo gradativamente substituídos por algumas empresas pela análise em *chips* de SNPs justamente pela grande quantidade de regiões genômicas acessadas ao mesmo tempo, como vimos no conteúdo anterior.

Os polimorfismos são mutações que se perpetuam na espécie com frequência igual ou superior a 1%. Assim, espera-se que um polimorfismo identificado no pai esteja presente no cromossomo que ele cedeu ao filho (já que o outro cromossomo do filho é herdado da mãe).

Quanto mais polimorfismos comuns forem identificados, maior a certeza em um teste de paternidade.

Da mesma forma são feitas as identificações de suspeitos de crimes.

Uma evidência contém amostra de DNA, e é necessária uma lista de suspeitos que tenham seu DNA extraído e analisado para confrontar com o material da cena do crime.

O indivíduo responsabilizado pelo crime é aquele que apresenta os mesmos polimorfismos do DNA de referência.

Os resultados são determinados por análise estatística que determina a probabilidade de vínculo biológico.

No teste de paternidade, por exemplo, é calculada a probabilidade de o suposto pai ser o pai biológico de um indivíduo contra a probabilidade de qualquer outra pessoa sê-lo.

Os laudos de criminalística apresentam essa probabilidade baseada na semelhança entre dois materiais genéticos. As conclusões, tanto de paternidade quanto de um crime, cabem a quem conduz o caso ou investigação.



Refleta

Atualmente, existem diversos bancos de DNA pelo mundo todo. O que esses bancos fazem é armazenar informações sobre o DNA de indivíduos que podem fornecer outras informações adicionais, como para Genética Forense e também para a área de medicamentos, tratamentos e conhecimento de doenças.

Respaldados por esses DNAs, a criminalística pode fazer cumprir uma célebre frase: condenar ou absolver um suspeito com uma única gota de sangue.

Porém, a questão ética que envolve essas análises também é muito forte, e a ampliação para bancos que forneçam boa cobertura de toda a população depende da aceitação de cada pessoa em doar seu material genético para análise.

O que você pensa a esse respeito? Como delimitar a utilidade desses bancos com a invasão da privacidade de cada indivíduo? Você doaria seu material genético para compor um banco de DNA?

### **Sequenciamento de nova geração (NGS)**

Nós estudamos, na primeira unidade desse livro, algumas análises de sequenciamento.

Sabemos que, independentemente da técnica, retorna como resultado a sequência de todos os nucleotídeos que compõem o genoma de determinada espécie.

Com essa informação, vimos que é possível obter muitas outras, inclusive na Genética Forense, porque especificidades no genoma, como ordem e tipos de nucleotídeos, também são usadas para a identificação de pessoas.

Porém, aprendemos técnicas de sequenciamento que são demoradas e caras.

Imagine sequenciar os 3 bilhões de pares de bases que compõem o genoma humano!

Parece realmente ser mais fácil genotipar e procurar os marcadores em regiões específicas. Em contrapartida, nenhuma dessas técnicas apresenta a precisão de descrição de um sequenciamento, capaz de acessar, sem exceção, todas as partes do genoma.

Com o objetivo de não abrir mão dessa análise, pesquisas continuam a ser desenvolvidas para aprimorar os testes de sequenciamento, e hoje podemos contar com o Sequenciamento de Nova Geração (NGS – *Next Generation Sequence*).

A evolução permitiu técnicas mais rápidas que as anteriores e com menores dificuldades de montagem.

Você se lembra de várias regiões que permaneciam sem sequenciamento pelas técnicas que estudamos e, por isso, era necessário criar biblioteca em vetores para sequenciá-las? Trabalhoso, não?

A necessidade de montagem ainda existe, pois o sequenciamento continua sendo feito por fragmentos de DNA, porém de forma mais eficiente.

Para entendermos o que nos trouxe essa nova geração de sequenciamento, estudaremos a análise pela técnica Ion Torrent.

Nesta técnica é feita a leitura do pH do meio convertida em voltagem.

As amostras (fragmentos de DNA em fita única) são colocadas nos chips de leitura e, então, no equipamento de Ion Torrent.

A cada 15 segundos uma nova solução de nucleotídeos (A, T, G, C) é injetada no aparelho entrando em contato com os fragmentos de DNA. Se este nucleotídeo se liga à fita, há a liberação de um íon  $H^+$ , que altera o pH do meio e é convertido em voltagem.

A alteração de voltagem é identificada como a adição de uma base nitrogenada, e como o aparelho sabe que solução de nucleotídeo injetou, o tipo de base também é identificado.



### Exemplificando

Considere que a próxima solução a ser injeta no chip do Ion Torrent contém o nucleotídeo timina, porém, no fragmento de DNA sequenciado, a próxima base é uma guanina. Não há a ligação dos nucleotídeos e, portanto, não há alteração de voltagem pela liberação de um íon  $H^+$ .

O equipamento remove essas bases com uma solução de lavagem e injeta a seguinte, que contém nucleotídeos citosina. A citosina se liga à guanina da fita de DNA que está sendo sequenciada e libera  $H^+$ , que é medido como uma alteração de voltagem. Então, o equipamento sabe qual nucleotídeo foi adicionado e assim continua a montar a sequência.

Se duas bases forem adicionadas em sequência, ou seja, caso houvesse na fita de DNA duas guaninas consecutivas, dois íons de hidrogênio seriam liberados e a voltagem apresentaria valor dobrado, o que também é entendido pelo *software* do equipamento.

Neste vídeo, apesar de ser em inglês, você pode ver o passo a passo do processo, como explicado acima. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=bCc16uozHVE>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

Este é só um exemplo de sequenciamento desenvolvido e ofertado como serviço por uma empresa, neste caso a Life Technologies. Existem outras metodologias e aparelhos empregados no NGS, como o HiSeq 2500 da Illumina.

## Sem medo de errar

Existem diversas análises no nível de DNA que podem ser feitas. Porém, no caso da busca por uma região genômica associada a uma doença, que é o caso do filho de Mariana, a melhor forma é procurar por marcadores genéticos, os polimorfismos, que podem revelar mutações que se manifestam como doenças. A análise de SNP, pela genotipagem em *chip* com sondas para milhares desses marcadores, resultaria em uma boa cobertura do genoma e a maior probabilidade de encontrar a variante associada à doença, para que durante o tratamento da terapia gênica seja injetado nas células do menino exatamente o gene que substituirá o gene causador da doença.

Para isso, amostras de sangue do garoto são coletadas para extração do DNA através de kits específicos, como vimos na Unidade 1, que promovem a lise celular, a remoção de lipídeos, proteínas e RNA que podem interferir na pureza do material em análise.

O material genético, até então em pequena quantidade, é amplificado por PCR, originando milhares de cópias, que serão injetadas nos *chips* de genotipagem que contêm sondas para analisar muitos marcadores SNP ao mesmo tempo. Cada fragmento de DNA hibridiza na sequência nucleotídica da sonda que o complementa.

Dessa forma, é identificado o perfil de marcadores SNP do menino e comparado com marcadores que já foram associados a doenças. Caso ele tenha alguns desses marcadores, será identificado o gene causador do problema de saúde que ele apresenta e um tratamento específico pode ser direcionado.

### Análise de parentesco

#### Descrição da situação-problema

Diego foi criado apenas pela mãe e quando completou 15 anos de idade quis conhecer o pai. A mãe disse que não tinha certeza sobre a identidade do pai biológico, mas sugeriu os nomes de dois ex-namorados. Diego então procurou o laboratório em que você trabalha, acompanhado da mãe e dos dois supostos pais, para realizar um teste de DNA. Você fez a análise por microssatélite e os resultados mostraram poucas regiões do genoma de Diego semelhantes às das outras três pessoas. Você escreve as probabilidades de parentesco no resultado do teste: 10% mãe, 4% pai 1, 1% pai 2. Como estes resultados poderiam ser interpretados? A análise está correta?

#### Resolução da situação-problema

Sabendo que metade dos cromossomos do filho é proveniente da mãe e a outra metade do pai, você esperava que parte dos microssatélites avaliados fosse igual aos da mãe e a outra parte complementar igual aos do pai. Se a quantidade de microssatélites de Diego iguais aos dos dois supostos pais é muito baixa, pode-se concluir que nenhum deles é seu pai biológico. Porém, a mãe, que com certeza é biológica, podendo confirmar isso por documentos, também apresentou baixa quantidade de marcadores compartilhados com o filho. Esse fato indica um possível erro na análise, já que metade dos marcadores ele recebeu da mãe. Pode ter ocorrido contaminação cruzada com DNA de outra pessoa, por exemplo, de quem manipulou a amostra no sequenciamento, ou qualquer outro erro que deverá ser corrigido com a realização de uma nova análise.

## Faça valer a pena

**1.** Após a conclusão do Projeto Genoma Humano, concluiu-se que os seres humanos apresentam 99% de similaridade no genoma, atribuindo ao 1% restante a variabilidade existente entre as pessoas. Essas mutações,

também chamadas de polimorfismos, atuam como marcadores genéticos em análises de DNA.

Sobre os diversos tipos de marcadores genéticos existentes e avaliados em testes de DNA, marque a alternativa correta.

- a) A análise de sequenciamento apresenta como resultado a sequência linear de mutações que podem ocorrer no genoma.
- b) Os microssatélites são identificados no genoma como uma sequência repetida de mais de 500 pb.
- c) As repetições dos marcadores minissatélites são menores que dos microssatélites.
- d) O SNP corresponde à troca de um único par de base nitrogenada.
- e) Em análises de RFLP, as endonucleases de restrição cortam fragmentos de DNA sempre nos mesmos tamanhos.

**2.** O sequenciamento de nova geração – NGS – engloba técnicas e instrumentação que facilitam a identificação dos nucleotídeos, permitindo resultados em tempo menor em relação às análises iniciais, de quando foram desenvolvidas as metodologias de sequenciamento.

A técnica Ion Torrent, da Life Technologies, é um exemplo de NGS. Sobre a metodologia usada nessa análise, assinale a alternativa verdadeira.

- a) Os íons hidrogênio liberados da ligação nucleotídica são medidos como variação na voltagem e reconhecidos pelo equipamento como base nitrogenada adicionada, identificando e determinando a sequência dela.
- b) A adição de nucleotídeos à fita única de DNA é medida como reação colorida. A ligação de cada base produz uma cor diferente responsável por identificá-la.
- c) Diversos fragmentos do DNA são clonados em vetores e avaliados em gel de eletroforese de acordo com seus tamanhos.
- d) A análise de genotipagem faz parte da nova geração de sequenciamento (NGS).
- e) A técnica Ion Torrent elimina a necessidade de montagem do genoma.

**3.** A Genética Forense utiliza dos conhecimentos e análises de DNA para auxiliar a justiça na resolução de casos, crimes e associações de parentesco.

O teste de paternidade é um exemplo bastante utilizado e que pode ser requisitado em laboratório por qualquer cidadão. Sobre a forma de analisar os resultados desse teste, qual é a alternativa correta?

- a) O teste emite a conclusão sobre o grau de parentesco entre dois indivíduos.
- b) Os resultados são dados em termos de probabilidade de parentesco entre dois ou mais indivíduos.
- c) Os resultados são baseados na identidade de dois genomas obtida por sequenciamento.
- d) Qualquer probabilidade de parentesco é considerada um resultado de paternidade positiva.
- e) O resultado do teste só é confiável se feito com marcadores moleculares do tipo microssatélites.

# Referências

ASCOM ABC. **Entenda como é produzida uma vacina:** vacina de influenza, Instituto Butantan. Disponível em: <<https://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-4906.pdf>>. Acesso em: 8 dez. 2017.

BACHOUD-LÉVI, N. et al. Neuroprotective Gene Therapy for Huntington's Disease Using a Polymer Encapsulated BHK Cell Line Engineered to Secrete Human CNTF. **Human Gene Therapy**, [S.l.], v. 11, n. 12, p. 1723-1729, 2004.

BANCO DE CORDÃO UMBILICAL DO BRASIL. **Como funciona o tratamento da leucemia com células-tronco do cordão umbilical.** 2013. Disponível em: <<http://bcubrasil.com.br/como-funciona-o-tratamento-da-leucemia-com-celulas-tronco-do-cordao-umbilical/>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

BIERNATH, A. Vacina da gripe: o que muda em 2017. **Abril**, abr. 2017. Disponível em: <<https://saude.abril.com.br/medicina/vacina-da-gripe-o-que-muda-em-2017/>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

BLAESE, M. et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. **Science**, [S.l.], v. 270, n. 5235, p. 475-480, 1995.

CROSS, D.; BURMESTER, J. K. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. **Clinical Medicine and Research**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 218-227, 2006.

DURING, M. J. et al. Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. **PMC**, [S.l.], v. 12, n. 12, p. 1589-1591, 2001.

ENTENDA como é o processo de fabricação da vacina contra o H1N1. **G1**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/fantastico/videos/t/edicoes/v/entenda-como-e-o-processo-de-fabricacao-da-vacina-contr-o-h1n1/4947262/>>. Acesso em: 8 dez. 2017.

HARRISON, S. C. Immunogenic cross-talk between dengue and Zika viruses. **Nature Immunology**, [S.l.], v. 17, p.1010-1012, 2016.

INSTITUTO BUTANTAN. **Produtos em desenvolvimento.** Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/producao/desenvolvimento/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA DO PARANÁ. **A genética na investigação criminal (DNA).** Disponível em: <<http://www.ic.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=7>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS BIO-MANGUINHOS. **Existem novos projetos de vacinas em desenvolvimento?** Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/perguntas-frequentes/69-perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-vacinas/215-existem-novos-projetos-de-vacinas-em-desenvolvimento>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **Dengue:** vírus e vetor. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobrevirus.html>>. Acesso em: 8 dez. 2017.

- Ion Torrent™ next-gen sequencing technology. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbxlfuKs>>. Acesso em: 5 jan. 2018.
- IPCT. Células-tronco. Disponível em: <<http://celulastroncors.org.br/celulas-tronco-2/>>. Acesso em: 20 dez. 2017.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable "Minissatélite" regions in human DNA. *Nature*, [S.l.], v. 314, p. 67-73, 1985.
- KOJIMA, H. et al. NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nature Medicine*, [S.l.], v. 9, p. 596-603, 2003.
- LACERDA, D. R. et al. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana*, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.
- LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, p. 88-90, 2001. 3. v.
- LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estudos Avançados*, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 31-69, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-401420100003000004&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-401420100003000004&script=sci_arttext&tlng=pt)>. Acesso em: 26 jan. 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue**: descrição da doença. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>>. Acesso em: 8 dez. 2017.
- MITSUYASU, R. T. et al. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells. *Nature Medicine*, [S.l.], v. 15, p. 282-292, 2009.
- MORGAN, R. A. et al. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science*, [S.l.], v. 314, n. 5796, p. 126-129, 2006.
- NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A. K.; DA SILVA, E. F. A. Terapia Gênica. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 7, n. 1, p. 109-116, 2002.
- OLIVEIRA, M. A revolução da terapia genética. **IstoÉ**, jan. 2013, atualizado em 21 jan. 2016. Disponível em: <[https://istoe.com.br/270736\\_A+REVOLUCAO+DA+TERAPIA+GENETICA/](https://istoe.com.br/270736_A+REVOLUCAO+DA+TERAPIA+GENETICA/)>. Acesso em: 18 dez. 2017.
- PINHEIRO, J.; ZEITOUNE, R. C. G. Hepatite B: conhecimento e medidas de biossegurança e a saúde do trabalhador de enfermagem. *Revista Enfermagem*, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 258-264, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ean/v12n2/v12n2a09>>. Acesso em: 9 jan. 2018.
- PINTO, C. A. B. P. P.; DOS SANTOS, J. B.; RAMALHO, M. A. P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 1990.
- PRODUÇÃO de Soro Antiofídico. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=LjUCcuyAdA4>>. Acesso em: 9 dez. 2017.
- SANOFI PASTEUR. **Vacinas para o amanhã**. Disponível em: <<http://www.sanofipasteur.com.br/nosso-compromisso/p-d/vacinas-para-o-amanha>>. Acesso em: 9 jan. 2018.
- SILVA, C. A. L.; QUEIROZ, P. R. **Importância dos marcadores microssatélites como prova forense de DNA na investigação de vínculo genético**. Disponível

em: <<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CHARLLEY%20ANCHIETA%20LOUREN%C3%87O%20SILVA%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Acesso em: 2 jan. 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Vacina contra Hepatite B. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 52, n. 5, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302006000500009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302006000500009)>. Acesso em: 8 dez. 2017.

TERAPIA Gênica (Escola Nova). Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=2D46hZxcliY>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

TILEMANN, L. et al. SUMO-1 Gene Transfer Improves Cardiac Function in a Large-Animal Model of Heart Failure. **Science translational medicine**, [S.l.], v. 5, n. 211, p. 159-211, 2013.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Estudo pode melhorar eficácia de tratamento de câncer de cérebro e de pele. **Jornal da USP**, dez. 2017. Disponível em: <<http://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-da-saude/estudo-pode-melhorar-eficacia-de-tratamento-de-cancer-de-cerebro-e-de-pele/>>. Acesso em: 4 fev. 2018.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Teste de paternidade**. Disponível em: <<http://eaulas.usp.br/portal/video.action?idItem=1967>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

ZARANTE, I. Terapia Gênica. **Medicina**, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 93-94, 2001.











ISBN 978-85-522-0577-7



9 788552 205777 >