

María da Conceição Ferreira de Oliveira
Marcos Carlos de Mattos
Edson Rodrigues Filho

ORGANIZADORES



Tópicos em química microbiana

oportunidades acadêmicas e biotecnológicas


Imprensa
Universitária
UFC


COLEÇÃO
DE ESTUDOS DA
PÓS-GRADUAÇÃO

Tópicos em química microbiana

**oportunidades acadêmicas
e biotecnológicas**

**Presidente da República**

Jair Messias Bolsonaro

Ministro da Educação

Milton Ribeiro

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC****Reitor**

Prof. José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque

Vice-Reitor

Prof. José Glauco Lobo Filho

Pró-Reitor de Planejamento e Administração

Prof. Almir Bittencourt da Silva

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Jorge Herbert Soares de Lira

**IMPrensa UNIVERSITÁRIA****Diretor**

Joaquim Melo de Albuquerque

CONSELHO EDITORIAL**Presidente**

Joaquim Melo de Albuquerque

Conselheiros*

Prof. Claudio de Albuquerque Marques

Prof. Antônio Gomes de Souza Filho

Prof. Rogério Teixeira Masih

Prof. Augusto Teixeira de Albuquerque

Prof.^a Maria Elias Soares

Francisco Jonatan Soares

Prof. Luiz Gonzaga de França Lopes

Prof. Rodrigo Maggioni

Prof. Armênio Aguiar dos Santos

Prof. Márcio Viana Ramos

Prof. André Bezerra dos Santos

Prof. Fabiano André Narciso Fernandes

Prof.^a Ana Fátima Carvalho Fernandes

Prof.^a Renata Bessa Pontes

Prof. Alexandre Holanda Sampaio

Prof. Alek Sandro Dutra

Prof. José Carlos Lázaro da Silva Filho

Prof. William Paiva Marques Júnior

Prof. Irapuan Peixoto Lima Filho

Prof. Cássio Adriano Braz de Aquino

Prof. José Carlos Siqueira de Souza

Prof. Osmar Gonçalves dos Reis Filho

* membros responsáveis pela seleção das obras de acordo com o Edital n.º 13/2019.

Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
Marcos Carlos de Mattos
Edson Rodrigues Filho
(Organizadores)

Tópicos em química microbiana

**oportunidades acadêmicas
e biotecnológicas**



Fortaleza
2021

Tópicos em química microbiana: oportunidades acadêmicas e biotecnológicas

Copyright © 2021 by Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, Marcos Carlos de Mattos e Edson Rodrigues Filho.

Todos os direitos reservados

IMPRESSO NO BRASIL / PRINTED IN BRAZIL

Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC)
Av. da Universidade, 2932, fundos – Benfica – Fortaleza – Ceará

Coordenação editorial

Ivanaldo Maciel de Lima

Revisão de texto

Leidyane Viana

Normalização bibliográfica

Marta Regina

Programação visual

Sandro Vasconcellos / Thiago Nogueira

Diagramação

Victor Alencar

Capa

Valdiano Araújo Macêdo

Imagem da capa

Edward Jenner by Pexels

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Bibliotecária Marta Regina Sales Barbosa CRB 3/667

T674 Tópicos em química microbiana [livro eletrônico] : oportunidades acadêmicas e biotecnológicas / organizadores Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, Marcos Carlos de Mattos, Edson Rodrigues Filho. - Fortaleza: Imprensa Universitária, 2021.
11.378 Kb : il. color ; PDF. - (Estudos da Pós Graduação)

ISBN 978-65-88492-66-6

1. Biotecnologias microbianas. 2. Química dos micro-organismos. 3. Metabólitos microbianos. I. Oliveira, Maria da Conceição Ferreira de (org.). II. Mattos, Marcos Carlos de (org.). III. Rodrigues Filho, Edson (org.).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	7
PREFÁCIO	8
APRESENTAÇÃO	10
<i>Edson Rodrigues Filho</i>	
SELEÇÃO E CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS PARA ESTUDO QUÍMICO	15
<i>Marilene Nunes Oliveira, Darlisson de Alexandria Santos, Ulisses Brigatto Albino, Sebastião da Cruz Silva, Simone Yasue Simote Silva</i>	
COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS	52
<i>João Evangelista de Ávila, Francisco Carlos Oliveira, Francisco das Chagas de Oliveira Freire, Mary Anne Sousa Lima, Francisco Geraldo Barbosa e Jair Mafezoli</i>	
MICOTOXINAS: os metabólitos tóxicos dos fungos	72
<i>Debora Bezerra de Sousa e Mary Anne Sousa Lima</i>	
ESTUDO BIOGUIADO DE MICRO-ORGANISMOS: uma estratégia para descoberta de compostos bioativos	105
<i>João Evangelista de Ávila, Fátima Miranda Nunes e Mary Anne Sousa Lima</i>	

**EPIGENÉTICA: uma alternativa para diversificar
a produção de metabólitos secundários**.....123
*Davi Dantas Guimarães, Antônia Torres Ávila Pimenta
e Mary Anne Sousa Lima*

**COCULTURA DE MICRO-ORGANISMOS
COMO ALTERNATIVA PARA EXPRESSAR
GENES SILENCIADOS**..... 136
*Maria Vieira de Brito, Francisco Marto Pinto Viana,
Fátima Miranda Nunes
e Maria da Conceição Ferreira de Oliveira*

**FERRAMENTAS E ESTRATÉGIAS PARA A EXPRESSÃO DE
PROTEÍNA RECOMBINANTE** 147
*Josiane Bezerra da Silva Lobão
e Eduardo Henrique Silva Sousa*

**A INTERDISCIPLINARIDADE DA QUÍMICA
DE MICRO-ORGANISMOS: dos genes ao
metabolismo secundário** 184
Luciana da Silva Amaral e Taícia Pacheco Fill

**POTENCIAL ENZIMÁTICO
DOS MICRO-ORGANISMOS**.....217
Christiana de Fátima Bruce da Silva

OS AUTORES.....244

AGRADECIMENTO

Os organizadores agradecem a todos os autores que acreditaram na ideia do livro e contribuíram na composição dos capítulos. Um agradecimento especial é dirigido aos cinco alunos de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química da UFC (Débora Bezerra de Sousa, Davi Dantas Guimarães, João Evangelista de Ávila, Josiane Bezerra da Silva Lobão, Maria Vieira de Brito), que iniciaram a redação de alguns dos capítulos durante as disciplinas cursadas (Tópicos Especiais em Química) em 2018. Aqui também agradecemos a participação dos autores da Unifesspa, Afinko Soluções em Polímeros, Unicamp e Embrapa, que contribuíram de forma especial para dar a este livro um caráter interinstitucional.

Agradecemos à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFC, em especial ao Prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho (Pró-Reitor), pelo apoio à edição do livro pelo Edital N° 13/2019 – Programa de auxílio à publicação de livros, o qual tornou possível a edição deste livro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de produtividade em pesquisa (PQ) dos organizadores, Prof.^a M. C. F. Oliveira (PQ-2; Proc.: 307667/2017-0), Prof. M. C. Mattos (PQ-2; Proc.: 306043/2018-1) e Prof. E. Rodrigues Filho (PQ-1B; Proc.: 304867/2017-9), e autores, Prof.^a M. A. S. Lima (PQ-2; Proc.: 302873/2018-0) e Prof. E. H. S. Sousa (PQ-2; Proc.: 308383/2018-4).

PREFÁCIO

A ideia de escrever o livro *Tópicos em química microbiana: oportunidades acadêmicas e biotecnológicas* nasceu em 2018 durante a disciplina Tópicos em Química Orgânica, oferecida a alunos de mestrado e doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Química (Conceito 6 na Capes) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Ao longo de dois semestres letivos, os alunos de pós-graduação matriculados na disciplina, que visava a apresentar uma “introdução à química de micro-organismos”, iniciaram a redação da maioria dos capítulos. Essa iniciativa foi apresentada a professores/pesquisadores, especialistas no tema, da UFC e de outras instituições, os quais contribuíram com a revisão e inclusão de novos capítulos do livro.

O livro se inicia com uma apresentação escrita pelo Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Nela, o professor destaca a importância do estudo químico dos micro-organismos para áreas estratégicas, como agricultura, fármacos, entre outras. Ele ressalta ainda a necessidade de capacitação de recursos humanos nessa linha de pesquisa, que hoje é muito modesta frente ao grande potencial da biodiversidade microbiana ainda inexplorada no Brasil e no mundo.

Em seguida, tópicos considerados de grande relevância para aqueles que trabalham (ou querem trabalhar) com química de micro-organismos estão apresentados nos nove capítulos deste livro. O primeiro capítulo foi

escrito por professores da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa), que apresentam ao leitor uma visão geral das fontes e tipos de micro-organismos comumente empregados nos estudos químicos. Alunos, professores da UFC e pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical contribuíram com a escrita do segundo ao sétimo capítulo. Estes capítulos descrevem alguns tipos de metabólitos secundários (segundo e terceiro capítulos) e estratégias empregadas na sua obtenção/diversificação (do quarto ao sexto capítulo). O sétimo capítulo apresenta os princípios básicos da tecnologia do DNA recombinante, um curto guia para planejamento, implementação e produção de proteínas recombinantes, com foco no uso da bactéria *E coli*. São abordadas opções comerciais de plasmídeos e a importante seleção da correta combinação de plasmídeo e cepa bacteriana, montada de forma estratégica para tornar possível a produção da proteína recombinante e sua purificação. O oitavo capítulo foi escrito por duas jovens pesquisadoras, sendo uma da empresa Afinko Soluções em Polímeros e outra da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Nesse capítulo, é abordado o aspecto interdisciplinar da química de micro-organismos, apresentando ao leitor uma visão geral da conexão entre genética, biologia molecular, bioinformática e a biossíntese de produtos naturais, principalmente policetídeos e peptídeos não ribossomais. O último capítulo, escrito por uma pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, aborda a influência da produção de enzimas por micro-organismos nas interações com plantas pertencentes aos agroecossistemas.

Por fim, esperamos que este livro, idealizado por brasileiros para atingir todos os leitores de língua portuguesa, seja apenas o primeiro de uma série de literatura acadêmica em química de micro-organismos e que desperte o interesse de pesquisadores de química de produtos naturais e áreas afins.

APRESENTAÇÃO

A pretensão dos autores deste livro é contribuir com a comunidade acadêmica, especialmente alunos de graduação e de pós-graduação, reunindo em uma mesma obra vários tópicos relacionados ao tema “química de micro-organismos”. Os vários capítulos foram preparados por colegas especialistas, com atuações recentes em pesquisas relacionadas ao tema, e contando com a participação de alunos de pós-graduação. É com grande satisfação que faço a apresentação deste livro. Considero o momento importante para que tenhamos iniciativas como esta, que certamente terá como consequência a melhoria da formação dos nossos alunos e a motivação de jovens pesquisadores para atuarem nessa área de grande importância acadêmica e tecnológica. Após algumas considerações gerais sobre a importância dos tópicos abordados, terminamos essa apresentação com um tom editorial, chamando os colegas leitores para atentar para as grandes possibilidades de avanços que podemos ter com a ampliação das nossas atuações em química de micro-organismos.

Os micro-organismos estão envolvidos em um vasto número de tecnologias importantes para a sobrevivência e o bem-estar do ser humano. Algumas dessas tecnologias já são clássicas e facilmente identificadas com processos microbiológicos, como as fermentações alcoólicas e a produção de ácido cítrico; e outras ainda são pouco divulgadas ao público, como a obtenção de polímeros biodegradáveis e uma série de materiais para usos estruturais diversos. Além disso,

há muitas tecnologias microbianas de grande aplicação na agricultura, para continuar produzindo em larga escala, mas com profundas preocupações com o meio ambiente e com a segurança alimentar. Já há uma série de biofertilizantes e bioinseticidas etc., que são tecnologias baseadas em micro-organismos disponíveis para atender a essa demanda.

Os micro-organismos têm sido também estudados e aplicados na remoção e reciclagem de resíduos industriais, em processos controlados usando fungos e bactérias para limpar a poluição ocasionada por vazamentos de produtos químicos e petróleo, por exemplo. Mais recentemente, estudos têm sido feitos com o objetivo de desenvolver micro-organismos para biodegradar plásticos sintéticos, que usam derivados do petróleo como materiais precursores, contribuindo para resolver um dos problemas mais graves de poluição do planeta atualmente.

No campo da medicina humana, os micro-organismos têm impactos diretos e indiretos. Os micro-organismos fitopatogênicos podem habitar de forma parasitária, deletéria, várias espécies de plantas importantes para todos os animais, impactando negativamente na disponibilidade de alimentos e podendo acarretar amplos problemas para a saúde dos seres humanos. Há um grande número de doenças de plantas que necessitam de constante atenção e controle para que plantações não sejam devastadas por essas doenças. Milho, soja, arroz, feijão, cacau etc. estão entre as plantações mais afetadas por doenças microbianas. Por outro lado, os micro-organismos, fitopatogênicos ou simbioses, podem acumular nas plantas produtos do seu metabolismo micromolecular, tradicionalmente chamados de micotoxinas. A ingestão de alimentos contaminados com essas substâncias pode produzir consequências letais para todos os animais, incluindo a espécie humana. Essas substâncias têm que ser monitoradas em toda a cadeia de produção de alimentos, do campo à mesa, pois elas estão entre os mais perigosos agentes carcinogênicos naturais. Além do monitoramento de micotoxinas clássicas, como as aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, tricotecenos etc., descobertas em países de clima subtropical, é importante pesquisar outras substâncias que podem ser tão perigosas quanto essas no Brasil, um país de grande diversidade de clima, mas com predominância tropical.

Certamente, a área em que as mais nobres tecnologias microbianas fazem uso da química de micro-organismos é a produção de moléculas que são fármacos ou aqueles compostos intermediários que podem ser convertidos em fármacos usando poucas etapas semissintéticas. Desde a pioneira descoberta da penicilina por Alexander Fleming, possibilitando o uso racional e rotineiro de antibióticos, muitas outras moléculas foram descobertas e produzidas em larga escala, contribuindo muito para o aumento da expectativa de vida humana e de outros animais no planeta. Dessa forma, já temos hoje um grande arsenal de fármacos de origem microbiana para uso no tratamento de muitas doenças humanas graves. No entanto, devido ao grande número de micro-organismos existentes, juntamente com uma fascinante biodiversidade, ainda há um enorme potencial para descoberta de micromoléculas de origem microbiana, seja em cepas selvagens ou modificadas geneticamente. Portanto, ainda há espaço para investigações químicas clássicas de produtos naturais microbianos, visando à obtenção de substâncias bioativas. Por outro lado, a exploração do genoma microbiano em células vivas (genômica), ou de micro-organismos não cultiváveis e resíduos celulares espalhados pelos ecossistemas (metagenômica), buscando expressão de genes biossintéticos novos ou silenciados, também vem sendo intensamente praticada, visando à ampliação da diversidade de produtos naturais disponíveis. Embora alguns grupos de pesquisas já estejam emergindo no Brasil, nós ainda temos muito poucos pesquisadores atuando nessa área relativamente à comunidade acadêmica mundial.

Tão importante quanto o conteúdo micromolecular microbiano são as enzimas produzidas por esses organismos. Os micro-organismos são seres heterotróficos, o que lhes impõe a sua associação com outros seres vivos ou substratos dos quais eles podem extrair os nutrientes necessários para a construção das suas organelas estruturais e produzir seu próprio conteúdo químico essencial. Além disso, a vida dos micro-organismos é continuamente ameaçada por outras espécies. A garantia da sobrevivência dos micro-organismos nos seus nichos ecológicos é suportada pela grande diversidade de enzimas que eles produzem. Os estudos sobre enzimas microbianas por diversos pesquisadores vêm resultando em uma série muito grande de possibilidades de aplicação em

biocatálises de reações orgânicas em moléculas simples e também de alta complexidade, facilitando a obtenção de substâncias importantes para o ser humano. Não é exagero dizer que uma célula microbiana pode ser comparada a uma fábrica de substâncias químicas (a expressão “microbial cell factory” aparece em um grande número de documentos que podem ser encontrados na web). A busca por enzimas e/ou extratos enzimáticos obtidos de cepas selvagens ou por expressão heteróloga é atualmente uma das mais importantes áreas de estudos envolvendo os micro-organismos. Não somente o conhecimento acadêmico nessa área já avançou muito, mas também o tema “enzimas” movimentou vários nichos dos setores industriais.

Essas são apenas algumas das áreas em que a “química de micro-organismos” ou é central ou está próxima do centro das atividades. De fato, além das inesgotáveis possibilidades de proposição e exploração de novas biotecnologias, a cada dia novos impactos dos micro-organismos na vida humana são observados. Ainda se sabe muito pouco, por exemplo, sobre o microbioma humano, a sua atuação no nosso organismo, e as consequências positivas e negativas. É necessário e urgente, portanto, a ampliação do número de pesquisadores atuando nessa área.

A formação de pessoal atuante em química de micro-organismos requer esforços na aquisição de conhecimento e no desenvolvimento de habilidade em diversas áreas das ciências. Isso envolve boa formação básica, principalmente em ciências exatas (matemática, física e química) e biológicas (microbiologia, genética, ecologia). No Brasil, as atividades identificadas com a química de micro-organismos têm sido realizadas em sua maioria dentro de linhas de pesquisas de grupos hospedados em departamentos de química, principalmente nas universidades estaduais e federais. Embora já tenhamos no país alguns poucos cursos de graduação em química com ênfase em biotecnologia (geral), ao que parece ainda não temos cursos de química com ênfase mais específica em biotecnologias microbianas. Nesse aspecto, a química de micro-organismos contribuiria para diferenciar e dar melhor identificação a cada um dos muitos cursos de graduação em química no Brasil, que, se iguais, não atendem as demandas regionais e não contribuem para o avanço do país.

Além da sua grande importância nos aspectos acadêmicos, sendo muitas vezes objeto central de estudos para o entendimento de processos vitais ocorrendo na natureza, a química de micro-organismos compõe a base de muitas atividades industriais e empresariais. Essas atividades são possibilidades reais para que jovens empreendedores possam abrir seus próprios negócios e produzir riquezas para o país e/ou contribuir para viabilizar ainda mais nossas capacidades de pesquisas, melhorando o acesso a insumos de uso rotineiro nas nossas atividades científicas, pelos quais pagamos altíssimos preços que agregam taxas de importação exorbitantes. Pesquisadores com olhares atentos à importância de cada molécula produzida, cada novo processo estabelecido, e ao valor monetário de cada uma das suas descobertas, mesmo que pequenas, deveriam enfatizar esses aspectos para seus alunos e sugerir estudos de viabilidade de produção e comercialização. Principalmente em tempos atuais, em um cenário social/político/econômico em erupção, ávido por mudanças, não podemos nos esquecer que os acadêmicos têm também papel importante na orientação, suporte e incentivo ao setor industrial, além de exercer com competência a geração e divulgação de conhecimentos científicos. Algumas instituições brasileiras de ensino superior já estão bastante engajadas na transformação de conhecimentos em negócios. Algumas empresas, as chamadas *spin-off*, emergem do setor acadêmico e se estabelecem em diversos setores. A área de química e biotecnologia microbiana é muito rica em possibilidades para explorações industriais e comerciais. Para a inspiração do leitor, uma busca rápida pelos termos “microbial (bio)technologies” e “company” pode localizar uma série de empresas já bem estabelecidas no mercado mundial.

Enfim, os assuntos discutidos em cada capítulo deste livro formam uma base inicial muito boa e completa para a motivação e formação de jovens pesquisadores iniciantes nos níveis de graduação e pós-graduação, além de mostrar uma visão global da área que pode ser interessante para pesquisadores já estabelecidos na carreira. Boa leitura!

Edson Rodrigues Filho

SELEÇÃO E CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS PARA ESTUDO QUÍMICO

*Marilene Nunes Oliveira, Darlisson de Alexandria Santos,
Ulisses Brigatto Albino, Sebastião da Cruz Silva,
Simone Yasue Simote Silva*

Introdução

Entre as estratégias utilizadas pela comunidade científica em busca de novas substâncias com aplicações biotecnológicas, destaca-se o estudo de micro-organismos, de forma isolada ou em associação. Essa estratégia de investigação vem crescendo nas últimas décadas como fonte promissora de macro e micromoléculas para aplicação nos diversos setores da indústria, em função dos novos padrões moleculares observados, o que gera a expectativa de novos produtos (HUANG; LIN, 2017).

De acordo com a literatura, os trabalhos iniciais a partir de micro-organismos se deram, principalmente, a partir de bactérias terrestres, visando à busca de novas substâncias com potencial biológico (BLUNT *et al.*, 2014). Atualmente, os mais diversos habitats e nichos ecológicos relacionados vêm sendo explorados, tais como o espaço inter e intracelular de espécies vegetais, ambientes marinhos e ambientes sob condições adversas ou extremas (alta ou baixa temperatura ou pressão, alto nível de acidez ou alcalinidade ou ainda altas concentrações de metais pesados). Esses nichos têm sido considerados fontes

de grande potencialidade à descoberta de substâncias com potencial para diversas aplicações (MILLER *et al.*, 2012; HUANG; LIN, 2017).

As seções que se seguem fazem um breve resumo sobre os principais e/ou mais explorados nichos ecológicos visando à prospecção e investigação de micro-organismos para a busca de novas substâncias e aplicações biotecnológicas.

Micro-organismos do solo

O solo é um recurso natural fundamental, e sua qualidade é formada por fatores químicos, físicos, biológicos e ecológicos, podendo ser modificado visando a uma melhor qualidade. A qualidade do solo é uma propriedade determinante para o aumento de produtividade e sustentabilidade das culturas, influenciando também na saúde das plantas, dos animais, da microbiota e, conseqüentemente, dos seres humanos (BUENO *et al.*, 2018).

O desenvolvimento dos primeiros microscópios rudimentares por Zacharias Janssen e Anton Van Leeuwenhoek representa momentos históricos que possibilitaram o estudo da microbiota do solo. Com o auxílio destes equipamentos, foram descobertos os “animáculos”, micro-organismos presentes em material vegetal em decomposição (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MATTOS, 2015).

A partir do século XX, a microbiologia do solo toma novos rumos, novas descobertas e se firma como ciência autônoma. Assim, surgem os primeiros livros relacionando a microbiota do solo com processos importantes para a produção agrícola. Nas décadas de 20 a 50, ocorreram as descobertas dos antibióticos, penicilina (*Penicillium notatum*) e gramicidina (*Bacillus brevis*). Selman Waksman, microbiologista do solo e pesquisadora da Universidade de Rutgers – EUA publica o livro *Principles of soil microbiology*, bíblia da microbiologia do solo, e, em 1952, ganha o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da estreptomicina (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MATTOS, 2015).

No final da década de 50 e início dos 60s, o mundo viveu a euforia das altas produtividades, resultantes do avanço científico e tecnológico que culminou com a chamada revolução verde, que tem como

base de produção o uso dos agroquímicos, o cultivo intensivo do solo e o melhoramento genético, relegando a segundo plano os processos biológicos do sistema. No século XXI, o solo é dito como um ecossistema diverso, porém foi usado para a disposição de resíduos e reciclagem de poluentes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MATTOS, 2015).

Assim, o solo, no qual se podem encontrar os mais diversos tipos de micro-organismo, é um corpo organizado que contém, provavelmente, maior número de indivíduos e diversidade biológica que qualquer outro hábitat ou ecossistema. Os organismos que compõem esse nicho desempenham funções essenciais para o funcionamento do ecossistema e também sofrem a ação de vários fatores. Esses organismos têm como função primária governar as reações de ciclagem e fluxo dos vários nutrientes essenciais, influenciando, assim, diretamente a fertilidade do solo, além de exercer efeitos na formação da estrutura e manutenção dos agregados e sua sanidade como meio de crescimento vegetal.

O manejo inadequado e exploração intensiva do solo pode ocasionar a sua degradação e, conseqüentemente, uma diminuição drástica dos seres que o habitam. Vale ressaltar que é necessário muito tempo e recurso para a recuperação da microbiota em solos degradados (BUENO *et al.*, 2018).

A população microbiana presente no solo pode ser estimada pelo número de células viáveis, número total de células, biomassa, taxa de crescimento e distribuição, taxa de manutenção, tempo de geração de toda a comunidade ou de organismos específicos. Estes organismos estão em um equilíbrio dinâmico dado pelas interações biótica e abiótica, que, de acordo com as modificações do meio ambiente, podem ser alteradas. A diversidade funcional dos organismos do solo é bastante elevada. Os principais micro-organismos do solo são bactérias, actinomicetos, fungos, algas e microfauna. As bactérias dominam a população microbiana, sendo sua presença acentuadamente superior à dos fungos (MATTOS, 2015).

As bactérias, por estarem presentes em maior quantidade, têm uma população em torno de 10^6 - 10^9 por grama de solo, com biomassa microbiana de 100 - 4.000 Kg/ha. Os principais gêneros são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Zanthomonas* e

Micoroccus, encontradas com maior frequência em comparação aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, *Methanobacillus* e *Ferrobacillus*, que têm uma frequência baixa no solo, no entanto são tão importantes quanto as anteriores (MATTOS, 2015).

Os fungos têm uma população em torno de 10^3 - 10^6 por grama de solo, com biomassa de 400 - 5.000 Kg/ha. Em geral, esses micro-organismos são aeróbicos, podendo se desenvolver em regiões mais profundas. Os principais gêneros são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Humicola*, *Alternaria*, *Phytium*, *Fusarium* e *Rhizopus* (MATTOS, 2015).

A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia no solo, podendo ter influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto no armazenamento de carbono e nutrientes minerais. Entretanto, somente a quantificação da biomassa não fornece indicações sobre os níveis de atividade das populações microbianas, sendo importante também avaliar outros parâmetros indicativos da atividade microbiana, bem como quantificar grupos de micro-organismos que desempenham papel-chave na dinâmica da matéria orgânica do solo (FERREIRA; STONE; MARTINS-DIDONTE, 2017).

Distribuição da microbiota

As relações ecológicas da ocorrência e distribuição geográfica dos diferentes tipos de micro-organismo no solo são difíceis de ser estabelecidas. Os solos sob cerrados, por exemplo, são pobres em espécies de bactérias e relativamente ricos em actinomicetos e fungos.

Entre as razões para a falta de informação acerca da diversidade microbiana, pode-se destacar que alguns micro-organismos não crescem em meios de cultura (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Estima-se que somente 1% das bactérias presentes no solo são cultiváveis em meios de cultura (GREEN; BOHANNAN, 2006).

Não se sabe como é a capacidade de dispersão da maioria dos micro-organismos. Algumas bactérias, fungos e actinomicetos mostram distribuição cosmopolita, a qual está relacionada ao ecossistema e manejo do solo de onde essas espécies foram isoladas (GOI; SOUZA, 2006).

Yogabaanu *et al.* (2017) isolaram 40 fungos do solo do Ártico e Antártico, e 45% das culturas fúngicas que foram ensaiadas expressaram ao menos atividade antimicrobiana em relação a pelo menos uma das cinco bactérias patogênicas testadas. Em suas pesquisas, Singh *et al.* (2015) realizaram o isolamento de 54 cepas fúngicas presentes no solo do estado indiano Uttar Pradesh, das quais sete cepas mostraram os mais altos níveis de tolerância e remoção de arsênico. Hallama *et al.* (2019), utilizando 354 amostras de solo de cidades da Tunísia, isolaram fungos queratinofílicos, também chamados de dermatófitos.

Fatores que afetam a microbiota

Os micro-organismos ocupam geralmente menos de 0,5% do espaço poroso do solo. O uso de métodos microscópicos associados a testes bioquímicos demonstra que apenas algumas células microbianas são fisiologicamente ativas, estando na sua maioria em estado dormente ou mortas, evidenciando as condições estressantes do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os principais fatores que afetam a distribuição da população microbiana, seja no solo e/ou no meio de cultivo, são a disponibilidade de substrato orgânico, que constitui o principal fator limitante, a temperatura, a umidade, a aeração, o pH, a disponibilidade de nutrientes minerais, a presença de micro-organismos antagonistas (parasíticos e predadores), o acúmulo de pesticidas e metais pesados e fatores de crescimento, tais como vitaminas, hormônios, aminoácidos e outros que são essenciais ao crescimento microbiano (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MATTOS, 2015).

Yogabaanu *et al.* (2017) realizaram a triagem inicial das propriedades antimicrobianas de 40 cepas fúngicas isoladas de solos e examinaram a influência da temperatura nos perfis gerais de produção de metabólitos secundários, verificando que a temperatura da cultura influenciou claramente na produção desses metabólitos, incluindo compostos com propriedades antimicrobianas frente a *Pseudogymnoascus* sp., *Penicillium flavigenum* e *Atradiydymella* sp.

Geisseler e Scrow (2014) analisaram as respostas dos micro-organismos do solo ao fertilizante mineral e constataram que a adição

de nitrogênio, por si só, não apresentou efeitos negativos sobre a biomassa microbiana do solo em culturas de sistemas agrícolas, sugerindo que a aplicação de nitrogênio não muda a composição da comunidade de plantas, quando se faz em ecossistemas gerenciados. No entanto, aplicações repetidas de nitrogênio por um longo prazo podem alterar a composição da comunidade microbiana em muitos casos, mesmo quando as mudanças de pH são pequenas.

Aplicação de micro-organismos do solo

Os micro-organismos do solo são metabolicamente muito ativos, e, atualmente, as pesquisas com esses organismos têm crescido, principalmente aqueles que têm apresentado potencial enzimático, produção de metabólitos com atividade farmacológica, produção de pigmentos, atuação na proteção contra patógenos, além dos micro-organismos que apresentam potenciais biorremediadores.

Atualmente, diversos micro-organismos do solo têm sido explorados com o objetivo de remediar áreas ambientais impactadas por metais, herbicidas etc. Alguns fungos mostraram-se promissores na tolerância e remoção de arsênico do solo das Planícies Indo-Gangéticas, na Índia, e na degradação do herbicida Acetochlor em culturas de milho e trigo (SINGH *et al.*, 2015; ERGUVEN, 2018).

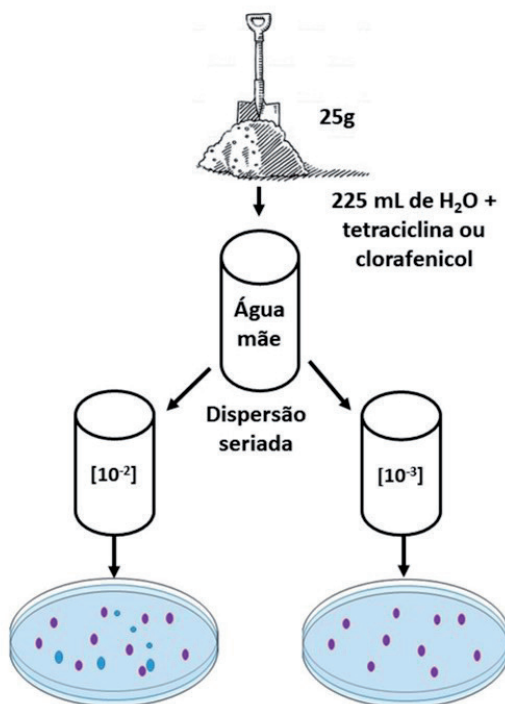
No que se refere à produção de metabólitos, Celestino *et al.* (2014), na busca por compostos produtores de pigmentos, isolaram 50 cepas fúngicas do solo amazônico, entre as quais identificaram duas linhagens, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., isolando de ambas o pigmento esclerotiorina, que é uma substância que possui um grande potencial para uso industrial e em atividades biológicas. Essa substância foi isolada anteriormente de *P. sclerotiorum* (CELESTINO *et al.*, 2014).

Coleta e isolamento de micro-organismos do solo

No estudo de prospecção de micro-organismos do solo, definem-se, inicialmente, a área de coleta e as diferentes profundidades a serem exploradas na amostragem.

Uma vez coletadas as amostras de solo, prepara-se uma suspensão-mãe utilizando água estéril e, a partir desta, diluições seriadas. Os inóculos em meios de culturas apropriados (alterados com antibióticos ou fungicidas) se fazem a partir das suspensões seriadas. A Figura 1 ilustra um protocolo de isolamento de fungos a partir de amostras de solo.

Figura 1 – Protocolo de isolamento de micro-organismos a partir de amostras de solo



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Micro-organismos endofíticos

Micro-organismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias, são micro-organismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar de imediato efeitos negativos aparentes, podendo as-

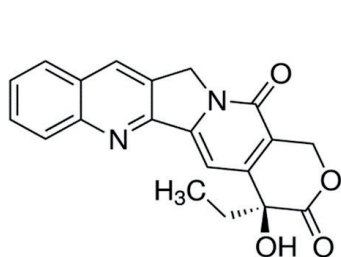
sociar-se a diferentes tecidos saudáveis acima ou sob o solo, tais como sementes, raízes, caule, folhas, frutos, tubérculos. É estimado que mais de um milhão de endófitos existam na natureza (JIA *et al.*, 2016; TAWFIKE *et al.*, 2017). De acordo com a literatura, em 300 mil espécies de plantas superiores, cada uma delas é hospedeira de um ou mais endófitos (RYAN *et al.*, 2008).

A comunidade científica nacional e internacional tem reconhecido que essa classe de micro-organismo representa uma importante fonte de novos metabólitos secundários bioativos. A literatura cita mais de 20.000 substâncias bioativas de origem microbiana com potencial citotóxico, antimicrobiano, antiviral, imunossupressor, entre outros (CHOI *et al.*, 2018). A maioria dessas substâncias apresenta estruturas moleculares complexas e inéditas, o que poderia ser explicado pela teoria que estabelece que essa produção metabólica depende do nicho ecológico no qual o micro-organismo está inserido e das consequentes interações bióticas e abióticas (CARTER, 2011).

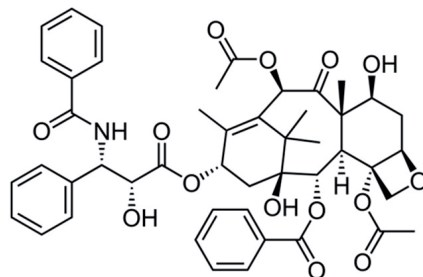
A constatação de micro-organismos associados a fósseis de plantas com data de milhões de anos sugere que a interação planta/micro-organismo existe desde a origem das plantas superiores. Em função desse longo tempo de associação, alguns endófitos podem ter desenvolvido um sistema que permite a transmissão de informação genética entre ele e seu hospedeiro (TAN; ZOU, 2001). Diversas são as contribuições originadas dessa associação: resistência à desidratação, tolerância a metais pesados e alta salinidade, aumento da taxa de germinação e crescimento, efeitos alelopáticos etc. (JIA *et al.*, 2016; AFZAL *et al.*, 2019). Em função das características citadas, os endófitos são considerados ferramentas potenciais para uso na agricultura como biofertilizantes e bioerbicidas.

Entre os diversos registros que marcam a grande relevância da área de química de micro-organismo, destaca-se a obtenção de substâncias isoladas primariamente a partir de seus hospedeiros e, atualmente, comercializadas para o tratamento de pessoas acometidas por câncer. Entre os medicamentos que apresentam seus princípios ativos produzidos por endófitos e hospedeiros, citam-se a camptotecina e o taxol, apresentados na Figura 2.

Figura 2 – Medicamentos com atividade anticâncer produzidos por micro-organismos endofíticos e seus hospedeiros



Hospedeiro: *Miquelia dentata*
 Endofítico: *Bacillus cereus*
 Bioproduto: Camptotecina
 Bioatividade: Anticâncer
 Fonte: Shweta et al. (2013).



Hospedeiro: *Taxus brevifolia*
 Endofítico: *Taxomyces andreanae*
 Bioproduto: Taxol
 Bioatividade: Anticâncer
 Fonte: Stierle, Strobel e Stierle (1993).

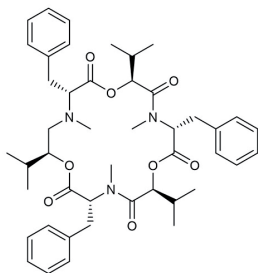
Esses achados científicos representam não somente um marco da teoria da transferência genética horizontal, engenharia genética *in vivo*, mas também caracterizam algumas vantagens da bioprospecção a partir de micro-organismos frente às plantas, a destacar o maior rendimento em função dos métodos de obtenção do produto natural e, principalmente, a contribuição para a preservação da biodiversidade.

Visando à prospecção de substâncias com propriedades biológicas úteis a partir de micro-organismos endofíticos, bem como endofíticos ainda não relatados, a teoria da transferência genética horizontal serviu de base para os parâmetros de seleção de uma planta para investigação de seus endófitos. São, portanto, promissoras:

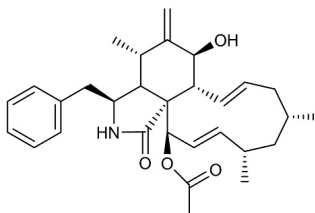
- Plantas com histórico etnobotânico de interesse, tais como plantas utilizadas por indígenas para cura de enfermidades;
- Plantas que habitam ambientes incomuns, portanto necessitando de estratégias diferenciadas para sua sobrevivência;
- Plantas endêmicas;
- Plantas em territórios com biodiversidade variada, como as áreas de florestas.

Atualmente, encontra-se na literatura uma variedade de registros da produção de substâncias por micro-organismos endofíticos, alguns desses exemplos estão relacionados na Figura 3.

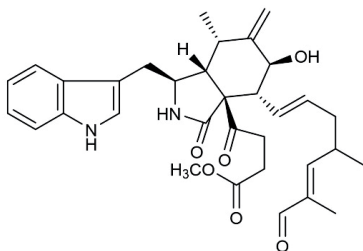
Figura 3 – Substâncias biologicamente ativas produzidas por micro-organismos endofíticos



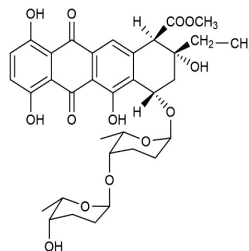
Hospedeiro: *Entada abyssinica*
 Endofítico: *Epicoccum nigrum*
 Bioproduto: Beauvericina
 Bioatividade: Antibacteriana
 Fonte: Dzoyem et al. (2016).



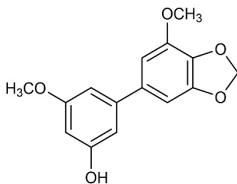
Hospedeiro: *Combretum lanceolatum*
 Endofítico: *Diaporthe phaseolorum* – 92C
 Bioproduto: 18-des-hidroxi-citocalasina
 Bioatividade: Antiparasitária
 Fonte: Brissow et al. (2017).



Hospedeiro: *Dioscorea opposita*
 Endofítico: *Chaetomium globosum*
 Bioproduto: Yamchaetoglobosina A
 Bioatividade: Citotóxica
 Fonte: Li et al. (2018).



Hospedeiro: *Isodon eriocalyx*
 Endofítico: *Streptomyces* sp.
 Bioproduto: Antraciclina misamicina
 Bioatividade: Citotóxica
 Fonte: Li et al. (2014).



Hospedeiro: *Boesenbergia rotunda*
 Endofítico: *Streptomyces* sp.
 Bioproduto: 3' - hydroxy-5,5' -dimethoxy-3,4-methylenedioxybiphenyl
 Bioatividade: Antibacteriana, antioxidante e anticancerígena
 Fonte: Taechowisan, Chaisaeng e Phutdhawong (2017).

Sabe-se que, apesar dos registros que comprovam a potencialidade dos micro-organismos endofíticos para gerar novos produtos biologicamente ativos, a maioria dos resultados permanece confinada nas academias ou ainda por explorar, com destaque para as bactérias endofíticas, bem menos exploradas em comparação aos registros sobre metabolismo secundário de fungos endofíticos (BRADER *et al.*, 2014).

Jia *et al.* (2016) sugerem estratégias para as pesquisas que serão desenvolvidas nas próximas décadas visando à descoberta de novas substância bioativas a partir de micro-organismos. As estratégias sugeridas são as seguintes:

- a) Imitar o ambiente natural do sistema endofítico/planta hospedeira;
- b) Selecionar um método de isolamento voltado ao endofítico alvo;
- c) Estabelecer uma biblioteca de fungos endofíticos que desempenham papel fundamental em suas plantas hospedeiras como uma forma de preservá-las;
- d) Desenvolver estratégias de preservação dos endofíticos alvos capazes de produzir substâncias de interesse (JIA *et al.*, 2016).

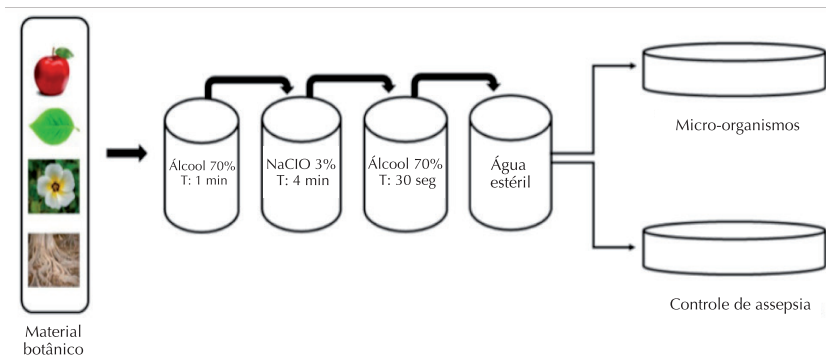
O avanço nos métodos de cultivo e na química de produtos naturais, mais precisamente no desenvolvimento das técnicas de isolamento e caracterização, associado ao desenvolvimento dos estudos do genoma de micro-organismos, tem gerado a expectativa de acesso a uma fonte potencialmente rica de novas drogas.

Coleta e isolamento de micro-organismos endofíticos

Uma vez que o objetivo é explorar os micro-organismos endofíticos, os cuidados iniciam-se pela coleta do material botânico. Recomenda-se que o material escolhido para o isolamento, folha, flores, caule, raiz ou frutos, seja de aparência saudável, portanto que não sejam encontradas evidências de ataques por herbívoros, insetos, micro-organismos patogênicos ou até mesmo fissuras, consequência de qualquer ato mecânico que o material tenha sofrido. Esse cuidado no ato da coleta diminui a incidência de isolamento dos micro-organismos indesejáveis, tais como os epifíticos ou patogênicos.

A partir do material coletado, um protocolo bastante utilizado para a eliminação de micro-organismos indesejáveis é realizado. Esse protocolo consiste em submeter o material botânico, após lavagem em água corrente, a uma sequência de imersões em soluções específicas por tempos determinados. A Figura 4 resume o referido protocolo.

Figura 4 – Protocolo de isolamento de micro-organismos endófitos



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Uma vez realizada a assepsia do material botânico, seus fragmentos são inoculados em meio de cultura, na maioria das vezes BDA (*batata dextrose agar*). Após alguns dias, as primeiras colônias fúngicas começam a emergir.

Para o controle do processo de assepsia, realizam-se inóculos no mesmo meio de cultura utilizado para a prospecção dos micro-organismos a partir da água ésteril. O não aparecimento de colônias fúngicas é o indicativo de que o processo de limpeza foi eficiente.

Micro-organismos de ambiente marinho

Estudos realizados visando a um maior entendimento dos micro-organismos que habitam os mares e oceanos têm revelado a importância dessa classe de micro-organismos para a produção de oxigênio, a remoção de dióxido de carbono da atmosfera, transporte e rotatividade dos elementos biológicos vitais e a regulação do clima da Terra (GLÖCKNER

et al., 2012). Essa descoberta levou a uma maior atenção da comunidade científica, aumentando nos últimos anos, de forma significativa, o conhecimento acerca dos micro-organismos marinhos e seu papel na natureza.

Parte das novas descobertas levaram à conclusão de que os micro-organismos marinhos participam ativamente dos ciclos biogeoquímicos do carbono, do nitrogênio, da sílica, do ferro e de outros elementos presentes nos mares e oceanos (HUTCHINS; MULHOLLAND, 2009). Além disso, é sabido que os mares e oceanos cobrem cerca de 70% da superfície terrestre e contêm a maior parte da biomassa do planeta.

É importante destacar que alguns desses micro-organismos encontrados no ambiente marinho são habitantes permanentes desse ambiente. No entanto, outros micro-organismos foram carregados do ambiente terrestre para os oceanos através dos rios (ROCHA *et al.*, 2013). Além disso, micro-organismos marinhos serão aqui considerados como qualquer micro-organismo que cresce em ambiente marinho, incluindo ambientes adjacentes ao mar, mas com baixa salinidade, tais como estuários e água salobra.

Relevância do estudo dos micro-organismos marinhos

O ambiente marinho apresenta características únicas quando comparado ao ambiente terrestre. As principais características que o diferenciam são alta salinidade, alta pressão hidrostática, baixa temperatura e baixa concentração de matéria orgânica. São diversos os ecossistemas presentes em variadas condições ambientais, tais como águas abertas, sedimentos, macro e micro-organismos, estuários, mangues, aberturas hipersalinas hidrotérmicas, águas profundas com alta pressão hidrostática, baixa temperatura, e vulcões marinhos. Essa variedade de habitat também aumenta a diversidade metabólica, o que os torna promissores para aplicações biotecnológicas, sobretudo porque produzem enzimas que são capazes de atuar sobre condições extremas de pH, pressão, salinidade, presença de compostos tóxicos, entre outras (ROCHA *et al.*, 2013).

Devido a tais características, os micro-organismos marinhos acabam por ser metabólica e fisiologicamente diferentes dos micro-organismos terrestres, cuja diferenciação pode levar à produção de compostos

orgânicos distintos. Por exemplo, metade das bactérias isoladas de ambiente marinho necessita de altas concentrações de NaCl durante o seu cultivo (DAS; LYLA; KHAN, 2006; IMADA, 2013).

Esse potencial tem sido comprovado ao longo dos estudos que têm sido realizados, uma vez que mais de 1.000 novos produtos naturais foram isolados a partir de micro-organismos marinhos, sendo que alguns desses novos compostos apresentam significativa atividade farmacológica (BRAMHACHARI *et al.*, 2019).

Uma outra potencialidade reside na produção de enzimas extremófilas. Por exemplo, foi feito o isolamento e clonagem de duas DNAs polimerases termoestáveis que foram isoladas dos micro-organismos *Thermus aquaticus* e *Pyrococcus furiosus*, as quais são utilizadas em pesquisas da biologia molecular (CHIEN; EDGAR; TRELA, 1976; LUNDBERG *et al.*, 1991). O uso dessas DNAs polimerases termoestáveis eliminou a necessidade de adição de enzimas novas após cada ciclo de PCR (reação em cadeia da polimerase) e tornou o processo mais utilizável para um número maior de aplicações (SANA, 2013).

Diversos processos químicos e biológicos utilizados atualmente pela indústria requerem o uso de micro-organismos ou enzimas isoladas que sejam capazes de realizar reações em condições ácidas ou alcalinas. Por exemplo, nas indústrias de detergentes ou de produção de biodiesel, enzimas tolerantes a ambientes alcalinos podem ser usadas sem perder a sua atividade quando submetidas a valores de pH mais extremos. Se as enzimas, além de serem resistentes a variações de pH, forem também resistentes a temperaturas acima de 60 °C, seu potencial de aplicação em processos biotecnológicos aumenta exponencialmente.

Uma das características mais desejadas para a aplicação de micro-organismos marinhos ou de enzimas isoladas é a tolerância ao uso de solventes orgânicos e de sais. Inclusive, atualmente já existem enzimas do tipo lipases que são muito resistentes a solventes orgânicos e que são utilizadas em estudos na produção de biodiesel a partir de triacilgliceróis e na síntese de compostos opticamente puros (DONATO *et al.*, 2018).

A água do mar é levemente básica (pH 7,5-8,4), e alguns aspectos físico-químicos do ambiente marinho podem ser determinantes para a vida microbiana, permitindo que ocorra uma grande diversidade

de micro-organismos com diversidade de enzimas e capacidades de adaptação em condições ambientais variadas. Esses aspectos físico-químicos são: 1) teor de oxigênio dissolvido na água – a concentração máxima de oxigênio na água é encontrada a uma profundidade de 10-20 m, enquanto a concentração mínima já pode ser encontrada entre 200 e 1.000 m; 2) a variação da luz no ambiente marinho, tendo em vista que muitos organismos usam a energia da luz para realizar fotossíntese ou mesmo para outras funções; e 3) a temperatura das águas – em mares tropicais a radiação solar é mais intensa, elevando a temperatura das águas para 25-30 °C, mudando a densidade da água em relação às águas profundas, uma vez que estas estão a 10 °C ou menos (MUNN, 2011).

Características dos micro-organismos marinhos

Com as técnicas atuais de identificação de micro-organismos, pela análise filogenética, tem sido possível identificar a presença das três diferentes linhagens de vida celular, conhecidas como os domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, no ambiente marinho (MUNN, 2011).

Destaca-se a importância do desenvolvimento das novas técnicas para a identificação de micro-organismos, envolvendo sequenciamento de regiões do genoma e reação em cadeia da polimerase (PCR), que tem permitido que a identificação de novos micro-organismos, nunca antes nem mesmo isolados, pudesse acontecer, aumentando, assim, a base de dados acerca dos micro-organismos de ambiente marinho. Um exemplo muito relevante foi a descoberta de uma bactéria marinha SAR11 (*Candidatus* “Pelagibacter ubique”) que é considerada o organismo mais abundante do planeta. Essa bactéria, que nunca antes havia sido isolada, representa 25% de todos os genes bacterianos identificados em quase todas as amostras de água do mar. Inclusive, sugere-se que 35% das células de micro-organismos presentes na camada superficial dos oceanos sejam dessa bactéria (MORRIS *et al.*, 2002; JOINT; MÜHLING; QUERELLOU, 2010).

Mesmo antes dos estudos com PCR, os micro-organismos marinhos sempre foram conhecidos como de difícil cultivo, uma vez que apenas uma pequena fração dos micro-organismos naturalmente presentes nesses ambientes foram cultivados em meios de cultura seletivos, cujo total não

ultrapassa 1% de todas as linhagens existentes (STALEY; KONOPKA, 1985; AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). No entanto, a técnica de PCR ajudou a revelar a maioria dessas linhagens microbianas ainda não cultivadas e abriu uma janela de possibilidades de estudo e aplicação do mundo microbiano dos ambientes marinhos.

Isolamento e coleta de micro-organismos marinhos

O isolamento dos micro-organismos marinhos, sejam eles endofíticos, de sedimentos ou mesmo da água, é realizado usando os mesmos protocolos para isolamento de endofíticos de plantas, de solo e de água doce. No entanto, são necessários alguns cuidados especiais para a realização de amostragem a fim de evitar que as amostras de sedimento, do plâncton marinho ou da água do mar sejam contaminadas.

Uma das medidas a serem tomadas é a escolha do local de coleta, pois este pode estar com algum tipo de contaminação, como a presença de compostos orgânicos liberados por navios, vazamento de petróleo ou mesmo com uma grande quantidade de sedimentos suspensos na água do mar. Para evitar esse tipo de contaminação, é sempre importante fazer a leitura das condições ambientais (pH, turbidez, incidência de radiação etc.) com o auxílio de microeletrodos e biossensores, a fim de que todo o material coletado seja representativo de uma extensa área do oceano (KARL; DORE, 2001).

Os resultados das análises físico-químicas do ambiente em que as amostras foram coletadas podem auxiliar na escolha das condições de isolamento e cultivo, uma vez que o pH, o teor de sais, a pressão e a temperatura podem ser replicadas em laboratório.

O estudo de micro-organismos marinhos que vivem em altas profundidades, sobretudo aquelas acima de 2.000 m, requer um cuidado ainda mais especial, pois os micro-organismos que lá vivem são considerados barofílicos, ou seja, suportam altas pressões. O estudo de bactérias dessa região dos oceanos, por exemplo, tem revelado que, embora algumas bactérias tenham conseguido sobreviver à descompressão, outras não conseguem, evidenciando que a pressão é um importante fator a ser considerado durante os estudos dos micro-organismos marinhos (YAYANOS; DIETZ; VAN BOXTEL, 1979).

A coleta de sedimentos pode ser realizada de duas maneiras: usando equipamentos de mergulho e um recipiente esterilizado, ou usando coletadores mecânicos controlados a partir de um navio ou barco. A primeira forma é mais utilizada para a coleta de sedimentos em regiões menos profundas, enquanto que a segunda é utilizada para sedimentos em regiões bem profundas dos oceanos (MUNN, 2011).

Além da coleta de amostras de água e sedimento, há também a necessidade de explorar os micro-organismos endofíticos em esponjas e algas marinhas. De um modo geral, a coleta desses organismos é realizada de acordo com a profundidade em que se encontram, como relatado anteriormente.

Micro-organismos extremófilos

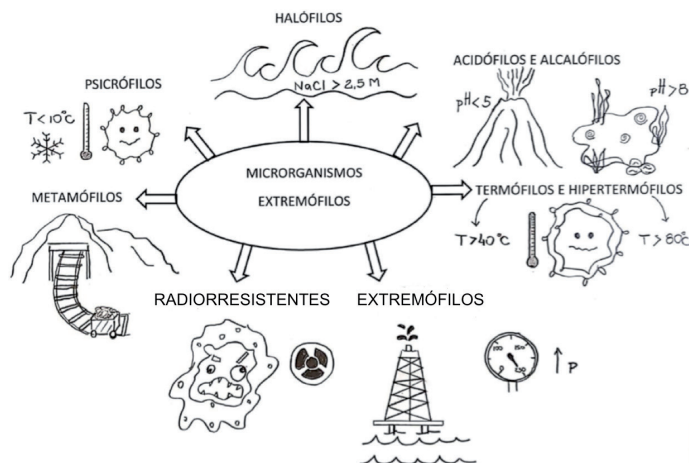
O estudo de micro-organismos que sobrevivem a ambientes hostis ou letais para a maioria dos seres vivos tem-se tornado alvo de interesse de muitos pesquisadores, principalmente para melhor entender sob quais condições a vida pode evoluir e subsistir e para compreender os mecanismos de sobrevivência empregados em condições ambientais extremas. O uso desses micro-organismos na biotecnologia também vem se tornando uma opção promissora, pois representam uma fonte de biomoléculas com capacidade biocatalítica, capazes de suportar várias condições em processos drásticos (FUJIWARA, 2002; RAMPELOTTO, 2010; WAKAI, 2018).

Quase todos os organismos precisam de condições favoráveis para sobreviver. No entanto, em habitats que *a priori* seriam considerados inóspitos ou até mesmo letais, muitos micro-organismos têm tido a capacidade de proliferar-se. Devido às circunstâncias em que vivem, são chamados de extremófilos, termo usado pela primeira vez por R. D. Macelroy em 1974, o qual sugeria que os componentes celulares dos extremófilos eram intrinsecamente estáveis aos ambientes extremos onde viviam e que poderiam ter evoluído de seus antepassados, podendo até mesmo ser o resultado de um acúmulo de mutações, ficando adaptáveis a uma variedade de condições consideradas extremas (MACELROY, 1974).

Atualmente, os micro-organismos extremófilos são definidos como aqueles capazes de desenvolver-se em ambientes extremos de temperatura, pH, pressão, salinidade, radiação e ou suas combinações. Vários micro-organismos que habitam esses tipos de ambiente possuem características fisiológicas adaptativas que lhes permitem sobreviver e desenvolver-se nessas condições. As condições extremófilas podem ocorrer por um determinado período de tempo ou de modo permanente e em qualquer tipo de ambiente (WAKAI, 2018).

Entre os vários tipos de extremófilo, podem ser citados os halófilos, que são aqueles que possuem adaptação em ambientes salinos; os termófilos e hipertermófilos adaptam-se a temperaturas elevadas (temperatura acima de 40 °C e acima de 80 °C, respectivamente); psicrófilos são os que se adaptam em condições de temperatura muito baixas (abaixo de 10 °C); os acidófilos e alcalófilos, com adaptação a extremos de pH (pH abaixo de 5 para os acidófilos e acima de 8 para os alcalófilos); metalófilos, aqueles que se adaptam a ambientes com altas concentrações de metais; e os micro-organismos radorresistentes, que possuem adaptação a altos níveis de radiação (RAMPELOTTO, 2010; HORIKOSHI, 2006). A Figura 5 ilustra os principais tipos de extremofilia.

Figura 5 – Principais tipos de extremofilia



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Halófilos

Os micro-organismos halófilos são encontrados em ambientes salinos, geralmente cloreto de sódio, fazendo desse sal um requisito para sua sobrevivência. De acordo com a concentração ótima de NaCl para seu crescimento, esses micro-organismos recebem uma classificação, sendo chamados halófilos extremos quando possuem crescimento em 15 a 30% de NaCl (2,5 a 5,2 M); halófilos moderados, em torno de 3 a 15% (0,5 a 2,5 M); halófilos leves, em torno de 1 a 3% (0,2 a 0,5 M). Esses tipos de micro-organismo conseguem sobreviver em ambientes hipersalinos porque são capazes de sustentar o equilíbrio osmótico (AMOOZEGAR *et al.*, 2017).

O Parque Nacional Salar de Huasco, localizado no Chile, perto da fronteira com a Bolívia, fica a aproximadamente 4.000 metros acima do nível do mar. É uma área grande de terras úmidas sustentadas por aquíferos subterrâneos de águas salgadas onde Remonsellez *et al.* (2018) conseguiram isolar e identificar seis gêneros de bactérias: *Aeromonas*, *Erwinia*, *Holomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* e *Shewanella*. Estudos recentes mostraram a presença de *Piscibacillus* sp., uma bactéria moderadamente haloalcalifílica, isolada pela primeira vez na Índia no Lago Sambhar, maior lago salino-alcálico localizado no interior da Índia. Extratos dessa bactéria apresentaram atividade anticancerígena contra o câncer de mama (NEELAN *et al.*, 2019).

Termófilos e hipertermófilos

Os mecanismos de adaptação dos termófilos e hipertermófilos ainda são um mistério para a ciência, pois ainda não é compreendido com clareza como as proteínas, por exemplo, as principais biomoléculas presentes nos organismos, não têm suas estruturas danificadas nesses tipos de micro-organismo quando submetidas a elevadas temperaturas (RAMPELOTTO, 2010).

A uma temperatura de 60 °C no deserto do Thar, também conhecido como grande deserto indiano, uma extensa região de deserto arenoso situado na região noroeste da Índia, areias foram coletadas e levaram

ao isolamento de oito cepas bacterianas, sendo cinco delas do gênero *Bacillus*, dois *Geobacillus* e uma *Aeribacillus* (NEELAN *et al.*, 2018).

Na região de Guelma, localizada no nordeste da Argélia, em quatro pontos diferentes, foram coletadas águas de fontes termais que variavam de 51 °C a 95 °C, das quais foram isoladas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus* e *Brevibacillus* (GOMRI; KHALDI; KHARROUB, 2018), sendo os dois primeiros gêneros também relatados por Neelan *et al.* (2018).

O continente antártico também é considerado uma fonte de micro-organismos extremófilos. Milhões de anos de isolamento produziram biodiversidade única com respostas adaptativas ao seu ambiente extremo. Embora o clima antártico seja particularmente frio, a presença de vários sítios geotérmicos, incluindo nascentes termais, fumarolas, solos quentes e fontes hidrotermais, oferece ambientes ideais para o desenvolvimento de micro-organismos termofílicos e hipertermofílicos (FLORES; CORREA-LLANTÉN; BLAMEY, 2018).

Psicrófilos

Micro-organismos que necessitam de temperaturas baixas (< 10 °C) para sobreviver recebem o nome de psicrófilos. A adaptação desses organismos pode ser explicada devido à alta concentração de ácidos graxos insaturados que ajudam a manter o estado semifluídico da membrana a baixas temperaturas, não comprometendo as suas funções e protegendo as células do congelamento (RAMPELOTTO, 2010).

Alguns exemplos de psicrófilos são as espécies fúngicas *Cadophora*, *Geomyces*, *Penicillium*, *Cosmospora* e *Cladosporium*, isoladas de amostras marinhas e terrestres coletadas na Ilha King George, situada no sul da Antártica, que tem temperatura média anual de -2,8 °C, variando entre 14 °C e -28 °C em alguns períodos (DUARTE *et al.*, 2018).

Existem também alguns micro-organismos capazes de sobreviver a mais de um tipo de condição extrema, como é o caso da bactéria do gênero *Pseudomonas*, isolada à temperatura de 7 °C do solo do Ártico, que também estava contaminado por bifenila policlorada,

classificada como poluente orgânico persistente (MASTER; MOHN, 1998; BAJAJ; SINGH, 2015).

Acidófilos e alcalófilos

Acidófilos e alcalófilos são os micro-organismos que sobrevivem a ambientes altamente ácidos ou altamente básicos e são incapazes de sobreviver em ambientes com pH próximo à neutralidade. Apesar desse nível de adaptação, ainda não foi esclarecido qual o mecanismo que os mantém vivos nessas extremidades. Acredita-se que os acidófilos oxidam o enxofre elementar (em áreas vulcânicas) ou os minerais sulfurosos (em região de mineração) para obter energia, produzindo ambientes ácidos (HORIKOSHI, 2006).

De fato, vários micro-organismos acidófilos foram isolados de áreas vulcânicas ou em área de mineração. As bactérias *Picrophilus oshimae* e *Picrophilus torridus* foram isoladas próximo a áreas vulcânicas no Japão, onde o pH era de 0,7 (SCHLEPER *et al.*, 1995). A bactéria *Ferroplasma acidarmanus* foi isolada de uma área de mineração em Iron Mountain, Califórnia, em um pH 0 (DOPSON *et al.*, 2004).

Takami *et al.* (1999) isolaram de amostras de areia coletada nas águas de Kaiko, Japão, a bactéria *Oceanobacillus iheyensis*. Outros micro-organismos, tais como *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus cohnii*, *Bacillus vedderi* e *Bacillus agaradhaerens*, também foram isolados de areias dos lagos Shala, Abijata e Arenguadi por Martins *et al.* (2001), no Parque Nacional Abijatta-Shalla, Etiópia, região de lagos altamente alcalinos.

Metamófilos

A bactéria *Arthrobacter* sp. foi isolada de um depósito de manganês no deserto de Sonora, Arizona. Essa bactéria foi submetida a altas radiações de raios ultravioletas para verificar sua sobrevivência simulando o ambiente hostil de Marte, que além de ser extremamente seco, como no deserto, possui radiação ultravioleta altíssima (LI *et al.*, 2019).

Em uma mina de prata localizada na província de Jiangsu, na China, Nie *et al.* (2015) isolaram a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Em

suas pesquisas, eles verificaram o potencial uso dessa bactéria para biolixiviação de minério de enxofre.

Micro-organismos radiorresistentes

Cox (2005), por meio de pesquisas realizadas com a bactéria *Deinococcus radiodurans*, uma bactéria radiorresistente, relatou que a espécie compensava danos extensos causados em seu DNA por adaptações que permitiam que as células evitassem os efeitos potencialmente prejudiciais às quebras nas fitas de DNA, sugerindo mecanismos que limitassem a sua degradação e que restringissem a difusão dos fragmentos que eram produzidos após a irradiação, para preservar a integridade genética. Esses mecanismos também aumentavam a eficiência das proteínas de reparo de DNA, podendo isso ser uma explicação para a sobrevivência de micro-organismos radiorresistentes (COX, 2005).

Existem muitos extremófilos que ainda não receberam classificação quanto aos ambientes extremos em que foram isolados, por exemplo, as espécies de fungos silvestres associados a resíduos de petróleo em Tamil Nadu, na Índia (GOPINATH; ANBU; HILDA, 2005). Há outros que já receberam classificação e estão em constantes pesquisas, sendo alvo de interesse para muitas áreas de conhecimento, desde a química, física e biologia até a astrobiologia, devido à empregabilidade que esses micro-organismos podem vir a conferir e também à possibilidade de vida em ambientes extremos, aumentando potencialmente a capacidade de habitabilidade do universo.

Técnicas de isolamento e cultivo de micro-organismos

A busca por moléculas de interesse, como as enzimas aplicadas à indústria ou metabólitos secundários ativos contra micro-organismos, células tumorais ou pragas da agricultura, leva muitos pesquisadores a fazer isolamentos constantes de micro-organismos em substratos diversos, como solos de florestas, água e sedimentos de corpos hídricos, materiais em decomposição, materiais oriundos de cavernas e ambientes extremos. Essa busca recebe a denominação de “bioprospecção”, um

ramo estabelecido da “biotecnologia”. Uma vez que se pretende prospectar moléculas produzidas por micro-organismos, essa busca pode ocorrer, atualmente, por três caminhos:

- a prospecção *in vivo*, quando se estudam micro-organismos presentes ou associados a plantas e animais vivos em laboratório ou campo;
- a prospecção *in vitro*, quando se analisam coleções de micro-organismos isolados, mantidos em meios de cultivo em laboratórios, podendo, inclusive, já estar depositados em coleções de referência;
- e, mais atualmente, a prospecção *in silico*, termo adaptado para expressar a busca por genes em sequências de DNA depositadas em bases de dados na internet.

A prospecção *in silico* vem ganhando visibilidade à medida que trabalhos vêm revelando a grande diversidade ambiental de micro-organismos não cultiváveis, sendo impossível mantê-los vivos em laboratório com a tecnologia disponível atualmente, mas que podem ter suas sequências genéticas reveladas a partir de técnicas como o DGGE (eletroforese em gel com gradiente de temperatura) (FISCHER; LERMAN, 1979; MUYZER, 1999) e a metagenômica (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Essas técnicas permitem a contagem e a identificação de micro-organismos existentes em amostras ambientais a partir de seu DNA, amplificado, sequenciado e com as sequências depositadas nas bases de dados. Uma grande base de dados já formada é a do projeto RNA Ribossomal (MAIDAK *et al*, 1997). Nessa base de dados, as sequências de DNA correspondente ao RNA ribossômico de cada espécie (micro e macro-organismos) são depositadas e podem ser comparadas com novas sequências. Esse projeto abriu uma nova era na identificação de organismos.

Neste subitem, trata-se da prospecção em que se isolam micro-organismos de um determinado substrato e se avaliam suas habilidades bioquímicas. Uma vez estabelecido o substrato onde se pretende prospectar, caso seja de um ambiente como o solo, faz-se necessário cumprir algumas determinações legais, como informar que se realizará a coleta, obter licença junto aos órgãos fiscalizadores (atualmente, no Brasil, quem controla coletas e acessos é o Instituto Chico Mendes de Biodiversidade,

o ICMBio) e, obtidos os micro-organismos, fazer a devida deposição em coleção de referência. Entre as coleções de referência estabelecidas, a da Fundação Oswaldo Cruz, no estado do Rio de Janeiro, vem sendo a mais contemplativa, cadastrada em diversas bases internacionais de registros. O Ministério do Meio Ambiente é o órgão máximo no Brasil para assuntos de acesso e registros do patrimônio genético.

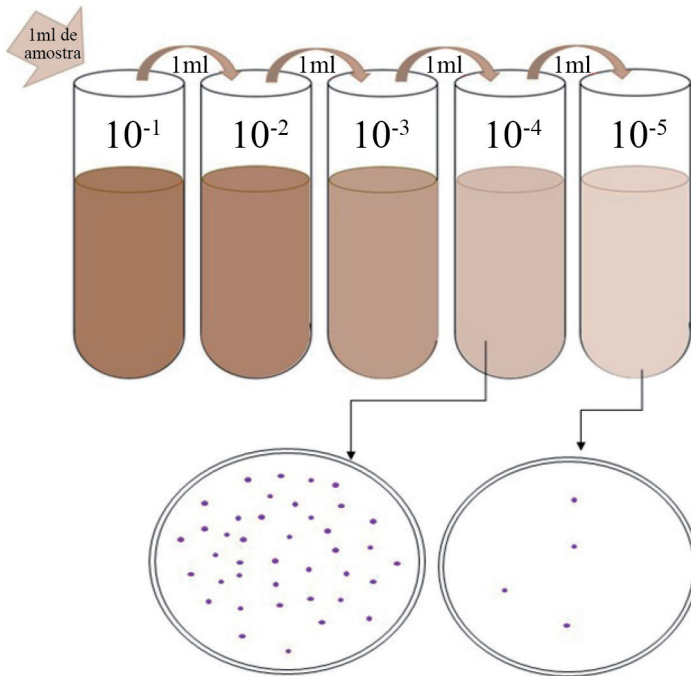
Essa modalidade de prospecção necessita que os micro-organismos sejam isolados e cultivados em laboratório em condições de expressar as características bioquímicas que exibem em seus habitats. Então, os cuidados e procedimentos para a coleta e transporte de amostras devem ser planejados de modo a se minimizarem as alterações no material. Desestruturação, aquecimento, congelamento, contaminação, desidratação, condições atmosféricas (considerar se os micro-organismos de interesse são aeróbios ou anaeróbios) são alguns dos fatores que podem reduzir as chances de se obterem micro-organismos viáveis em laboratório a partir de amostras ambientais.

Uma vez em laboratório, um passo importante no isolamento de micro-organismos é investigar o “tamanho da população” onde ele vive, realizando-se a contagem de UFCs (unidades formadoras de colônias) presentes em unidades de amostra (mL ou g). A técnica mais utilizada para essa medição é o espalhamento superficial de diluições decimais da amostra sobre meios de cultivo sólidos (Figura 6), ou seja, meios de cultivo que levam em sua composição um agente gelificante, o ágar. Assim, obtêm-se colônias de micro-organismos passíveis de ser contadas e diferenciadas conforme suas características. Se uma diluição de amostra ambiental for inoculada em meio de cultivo líquido, os micro-organismos também crescerão, desde que as necessidades nutricionais e fisiológicas (pH, aeração, osmolaridade, temperatura) sejam contempladas. No entanto, será impossível diferenciar visualmente os diversos tipos de micro-organismos desenvolvidos, pois formar-se-á uma solução turva. Após a incubação, as UFCs presentes na amostra se transformarão em colônias contáveis, e a aplicação das fórmulas adequadas revelará quantas UFCs estavam presentes em um grama ou um mililitro de amostra.

O termo UFC foi adotado porque nem sempre uma colônia é derivada de uma única célula microbiana. Alguns micro-organismos,

como os fungos filamentosos ou bactérias esféricas, os “cocos”, são encontrados na natureza em agrupamentos de duas ou várias células, como as hifas fúngicas ou os diplococos, estrepto e estafilococos.

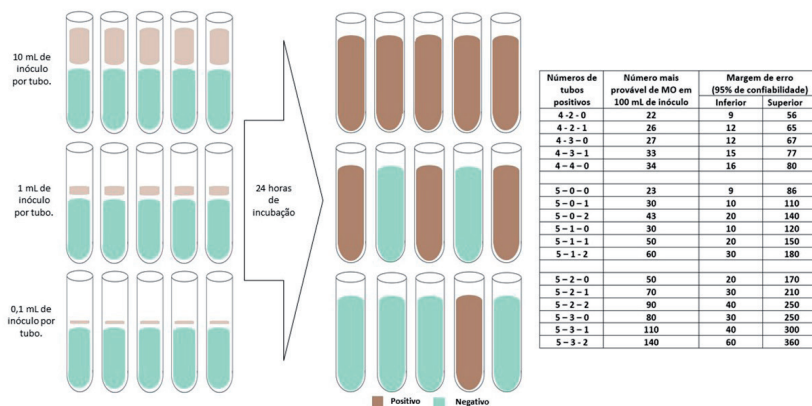
Figura 6 – Diluição decimal e colônias após espalhamento superficial



Fonte: adaptada de Torotoro, Funke e Case (2000).

Outras técnicas, como a obtenção do número mais provável (NMP) ou a contagem direta em câmara de Neubauer, também podem ser aplicadas, cada uma com sua vantagem ou desvantagem. No método da contagem de NMP, mais utilizado para amostras de material líquido, a diluição decimal é realizada dentro de tubos de ensaio, com repetições, contendo o meio de cultivo de crescimento do micro-organismo; conforme o número de tubos que apresentam crescimento após a incubação, uma tabela leva ao possível número de micro-organismos vivos por 100 mL de amostra (Figura 7).

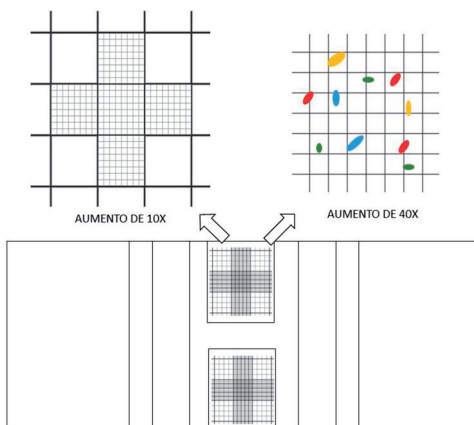
Figura 7 – Número mais provável e câmara de Neubauer



Fonte: adaptada de Tortora, Funke e Case (2000).

Na câmara de Neubauer (Figura 8), a amostra líquida ou sólida diluída é inoculada em volume conhecido diretamente na câmara: uma lâmina de vidro escavada com campos quadriculados desenhados. Essa câmara é levada ao microscópio, e a contagem é realizada diretamente. O método é muito rápido, porém não permite diferenciar células vivas ou mortas.

Figura 8 – Esquema de uma câmara de Neubauer

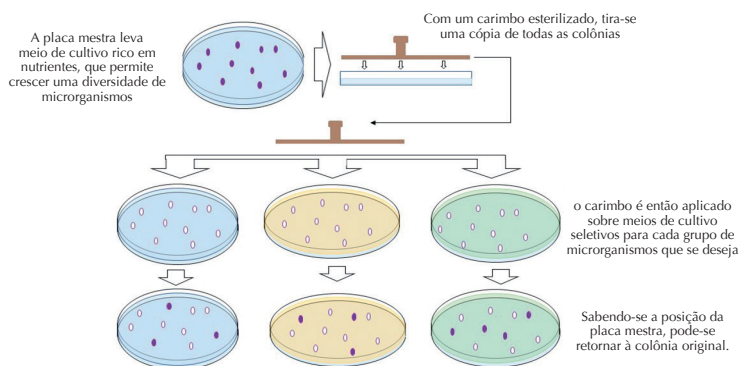


Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Definindo o meio de cultivo a ser utilizado no isolamento

Algumas decisões estratégicas precisam ser tomadas pela equipe antes de iniciar um processo de isolamento de micro-organismos de um determinado substrato. Uma delas é a definição do meio de cultivo a ser utilizado no primeiro momento. Há quem prefira iniciar já inoculando o material diluído em um meio seletivo que já revele os micro-organismos com a habilidade desejada (meio seletivo). Alguns pesquisadores, no entanto, afirmam que o micro-organismo, ao vir da natureza, pode ter dificuldade em expressar pela primeira vez determinadas características e pode não crescer no meio seletivo, mesmo tendo a habilidade desejada. Eles preferem, então, utilizar um meio “rico” onde cresçam muitos micro-organismos e, depois, submeter os isolados a meios seletivos (utilizando a técnica de *replica plate*, por exemplo). Pela *replica plate* (LEDERBERG; LEDERBERG, 1952), a placa mestra é “carimbada” em placas contendo meios de cultivo variados (Figura 9). As colônias que crescerem nos meios seletivos podem, então, ser resgatadas da placa mestra e isoladas. Uma outra possibilidade é isolar todas as colônias crescidas na placa mestra e trabalhar cada colônia separadamente, inoculando-as em meios seletivos sólidos ou líquidos.

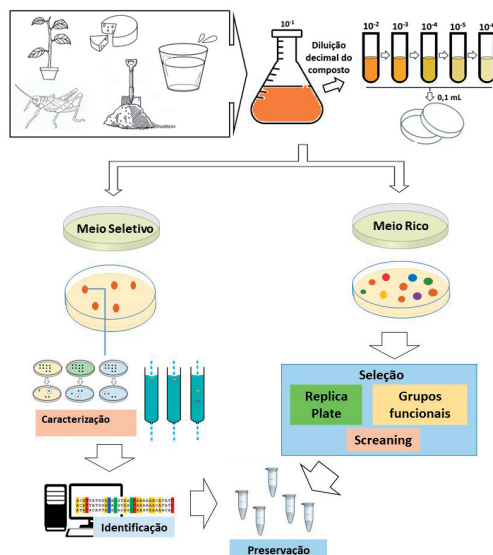
Figura 9 – Esquema da técnica de *replica plate*



O meio de cultivo ágar MacConkey (MACCONKEY, 1900) é um exemplo clássico de meio de cultivo seletivo, por conter em sua formulação sais biliares. Esse meio submete os micro-organismos nele inoculados a uma pressão de seleção semelhante à enfrentada pelos micro-organismos que habitam o intestino dos animais de sangue quente. A maioria das bactérias e fungos não resiste aos sais biliares que saponificam suas membranas plasmáticas. Os micro-organismos adaptados ao ambiente intestinal, no entanto, apresentam características que permitem manter a integridade das membranas na presença desses sais. Um micro-organismo que cresça bem em meio ágar MacConkey pode ser chamado de imediato de “coliforme total” (nome dado aos micro-organismos não intestinais que toleram sais biliares; coliforme = semelhante à bactéria *Escherichia coli*). A combinação de sais biliares e temperaturas semelhantes às do intestino humano, ou a fermentação de lactose, permite classificar um micro-organismo em “coliforme fecal”.

A Figura 10 representa um esquema geral de isolamento de micro-organismos para bioprospecção.

Figura 10 – Esquema do processo de isolamento de micro-organismos para bioprospecção



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Em outras situações, o meio de cultivo NFB (bactérias fixadoras de nitrogênio) (DÖBEREINER; DAY, 1976) restringe o crescimento de micro-organismos incapazes de absorver o nitrogênio atmosférico. Amostras de material ambiental, como solo ou água, inoculados nesse meio de cultivo, terão revelados seus micro-organismos fixadores de nitrogênio atmosférico, cultiváveis, lembrando que estudos de genômica revelam que a maioria dos micro-organismos presentes nas amostras ambientais não são passíveis de cultivo *in vitro*.

Duas categorias de meios de cultivo ainda devem ser discutidas pela equipe conforme seus propósitos: se os meios serão quimicamente definidos ou quimicamente complexos. Todo meio de cultivo leva em sua composição água e os nutrientes básicos para que o micro-organismo possa constituir suas células e então se reproduzir. No entanto, alguns meios levam em suas fórmulas somente compostos purificados, normalmente comprados de empresas especializadas, em pó, que são dissolvidos em água destilada. A reprodutibilidade de um meio assim, chamado de “quimicamente definido”, é garantida. Outros meios de cultivo levam em suas composições produtos naturais como produtos de digestão enzimática de carne para fornecer aminoácidos aos micro-organismos, ou extrato de leveduras, um composto rico em carbono e os demais elementos necessários à construção das macromoléculas, no entanto com a composição fina indefinida. Esses meios de cultivo, denominados “quimicamente complexos”, são, normalmente, bastante nutritivos, assegurando a boa reprodução dos micro-organismos inoculados, mas têm sua composição variável, uma vez que não se conhece com precisão a composição dos produtos naturais. O meio BDA (batata - dextrose - ágar), muito utilizado para o cultivo de fungos filamentosos é um bom exemplo de meio quimicamente complexo. A fonte de carbono de sua fórmula é o caldo de batatas cozidas em água destilada, obviamente rico em amido e em alguns açúcares de menor tamanho estrutural, porém de composição variável.

Referências

AFZAL, I. *et al.* Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, v. 221, p. 36-49, Apr. 2019.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 1, p. 143-169, Mar. 1995.

AMOOZEGAR, M. A. *et al.* Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology*, v. 163, n. 5, p. 143-169; 623-645, May 2017.

BAJAJ, S.; SINGH, D. K. Biodegradation of persistent organic pollutants in soil, water and pristine sites by cold-adapted microorganisms: mini review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 100, p. 98-105, May 2015.

BLUNT, J. W. *et al.* Marine natural products. *Natural Product Report*, v. 31, p. 160-258, Jan. 2014.

BRADER, G. *et al.* Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p. 30-37, June 2014.

BRAMHACHARI, P. V. *et al.* Secondary metabolites from marine endophytic fungi: emphasis on recent advances in natural product research. In: SINGH, B. P. (ed.). *Advances in endophytic fungal research*. Switzerland: Springer Nature, 2019. p. 339-350.

BRISSOW, E. R. *et al.* 18-des-hydroxy cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum* – 92C, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. *Parasitology Research*, Berlin, v. 116, n. 7, p. 1823-1830, May 2017.

BUENO, P. A. A. *et al.* Indicadores microbiológicos de qualidade do solo em recuperação de um sistema agroflorestal. *Acta Brasiliensis*, v. 2, n. 2, p. 40-44, maio 2018.

CARTER, G. T. Natural products and pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. *Natural Product Report*, v. 28, n. 11, p. 1783-1789, Sept. 2011.

CELESTINO, J. R. *et al.* Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 4, p. 569-575, Apr. 2014.

CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; TRELA, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, v. 127, n. 3, p. 1550-1557, Sept. 1976.

CHOI, S-S. *et al.* Genome engineering for microbial natural product discovery. *Current Opinion in Microbiology*, v. 45, p. 53-60, Oct. 2018.

COX, M. M.; BATISTA, J. R. *Deinococcus radiodurans*: the consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 11, p. 882-892, Nov. 2005.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman: Washington State University Press, 1976. v. 2, p. 518-538.

DONATO, P. *et al.* Exploring marine environments for the identification of extremophiles and their enzymes for sustainable and green bioprocesses. *Sustainability*, v. 11, n. 149, p. 1-20, Dec. 2018.

DOPSON, M. *et al.* Characterization of ferroplasma isolates and ferroplasma acidarmanus sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2079-2088, Apr. 2004.

DUARTE, A. W. F. *et al.* Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, v. 41, n. 12, p. 2511-2521, Dec. 2018.

DZOYEM, J. P. *et al.* Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 27, n. 2, p. 251-253, Dec. 2016.

ERGUVEN, G. O. Comparison of some soil fungi in bioremediation of herbicide acetochlor under agitated culture media. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 100, n. 4, p. 570-575, Jan. 2018.

FERREIRA, E. P. B.; STONE, L. F.; MARTINS-DIDONTE, C. C. G. População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção. *Revista Ciência Agronômica*, v. 48, n. 1, p. 22-31, jan./mar. 2017.

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in 2-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, v. 16, n. 1, p. 191-200, Jan. 1979.

FLORES, P. A. M.; CORREA-LLANTÉN, D. N.; BLAMEY, J. M. A thermophilic microorganism from Deception Island, Antarctica with a thermostable glutamate dehydrogenase activity. *Biological Research*, v. 51, n. 55, p. 1-7, Dec. 2018.

FUJIWARA, S. Extremophiles: developments of their special functions and potential resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p. 518-525, Feb. 2002.

GEISSELER, D.; SCROW, K. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms: a review. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 75, p. 54-63, Aug. 2014.

GLÖCKNER, F. O. *et al.* *Marine microbial diversity and its role in ecosystem functioning and environmental change*. Ostend, Belgium: Marine Board-ESF, 2012. 84 p. (Marine board position paper 17).

GOI, S. R.; SOUZA, F. A. Diversidade de micro-organismos do solo. *Revista Floresta e Ambiente*, v. 13, n. 2, p. 46-65, nov. 2006.

GOMRI, M. A.; KHALDI, T. E. M.; KHARROUB, K. Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural. *Annals of Microbiology*, v. 68, n. 12, p. 915-929, Nov. 2018.

GOPINATH, C. B. S.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, v. 46, n. 2, p. 119-126, Apr. 2005.

GREEN, J.; BOHANNAN, J. M. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 21, n. 9, p. 502-507, Sept. 2006.

HALLAMA, M. *et al.* Hidden miners: the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant Soil*, v. 234, n. 1/2, p. 7-45, jan. 2019.

HORIKOSHI, K. *Alkaliphiles*: genetic properties and applications of enzymes. Tokyo: Kodansha, 2006. 241 p.

HUANG, T.; LIN, S. Microbial natural products: a promising source for drug discovery. *Journal of Applied Microbiology and Biochemistry*, v. 1, n. 2/5, p. 1-3, Mar. 2017.

HUTCHINS, D. A.; MULHOLLAND, M. R.; FU, F. Nutrient cycles and marine microbes in a CO₂-enriched ocean. *Oceanography*, v. 22, n. 4, p. 124-145, Dec. 2009.

IMADA, C. Treasure hunting for useful microorganisms in the marine environment. In: KIM, S. K. (ed.). *Marine microbiology: bioactive compounds and biotechnological applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. cap. 2, p. 21-32.

JIA, M. *et al.* A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-14, June 2016.

JOINT, I.; MÜHLING, M.; QUERELLOU, J. Culturing marine bacteria: an essential prerequisite for biodiscovery. *Microbial Biotechnology*, v. 3, n. 4, p. 564-575, June 2010.

KARL, D. M.; DORE, J. E. Microbial ecology at sea: sampling, sub-sampling and incubation considerations. In: PAUL, J. H. (ed.). *Methods in Microbiology*. Burlington: Academic Press, 2001. v. 30, p. 13-39.

LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, v. 63, n. 3, p. 399-406, Mar. 1952.

LI, K. M. *et al.* Complete genome sequence of *Arthrobacter sp.* strain MN05-02, a UV-resistant bacterium from a manganese deposit in the sonoran desert. *Journal of Genomics*, v. 7, p. 18-25, Feb. 2019.

- LI, S. J. *et al.* Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 156, p. 316-343, Aug. 2018.
- LI, W. *et al.* A new anthracycline from endophytic *Streptomyces* sp. YIM66403. *The Journal of Antibiotics*, v. 68, n. 3, p. 216-219, Sept. 2014.
- LUNDBERG, K. S. *et al.* High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, v. 108, n. 1, p. 1-6, Dec. 1991.
- MACCONKEY, A. T. Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli* communis and the *Bacillus typhi* abdominalis. *The Lancet*, v. 156, n. 4010, p. 20, July 1900.
- MACELROY, R. D. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, v. 6, n. 1, p. 74-75, July 1974.
- MAIDAK, B. L. *et al.* The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 1, p. 109-110, Jan. 1997.
- MARTINS, R. F. *et al.* Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. *Extremophiles*, v. 5, n. 2, p. 135-44, Apr. 2001.
- MASTER, E. R.; MOHN, W. W. Psychrotolerant bacteria isolated from Arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 12, p. 4823-4829, Dec. 1998.
- MATTOS, M. L. T. Microbiologia do solo. In: NUNES, R. R.; REZENDE, M. O. O. (org.). *Recurso solo: propriedades e usos*. São Carlos: Cubo, 2015. cap. 8, p. 250-272.
- MILLER, K. I. *et al.* Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity. *Microbial Ecology*, v. 64, n. 2, p. 431-449, Aug. 2012.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: editora UFLA, 2006. 729 p.

MORRIS, R. M. *et al.* SAR11 clade dominates ocean surface bacterio-plankton communities. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 806-810, Dec. 2002.

MUNN, C. B. *Marine microbiology: ecology and applications*. 2. ed. New York: Taylor & Francis, 2011. 374 p.

MUYZER, G. DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural communities. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, n. 3, p. 317-322, June 1999.

NEELAN, D. K. *et al.* Characterization, phylogenetic analysis and potential applications of heterotrophic bacteria inhabit sand dunes of Thar Desert, India. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 1887-1898, Dec. 2018.

NEELAN, D. K. *et al.* A *Piscibacillus sp.* isolated from a soda lake exhibits anticancer activity against breast cancer MDA-MB-231. *Microorganisms*, v. 7, n. 2, p. 34, Jan. 2019.

NIE, H. *et al.* Isolation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain Z1 and its mechanism of bioleaching copper from waste printed circuit boards. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, v. 90, p. 714-721, Mar. 2015.

RAMPELOTTO, P. H. Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability*, v. 2, n. 6, p. 1602-1623, June 2010.

REMONSELLEZ, F. *et al.* Characterization and salt response in recurrent halotolerant *Exiguobacterium sp.* SH31 isolated from sediments of Salar de Huasco, Chilean Altiplano. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1-17, Sept. 2018.

ROCHA, L. C. *et al.* Bioactive marine microorganisms for biocatalytic reactions in organic compounds. In: KIM, S.-K. (ed.). *Marine microbiology: bioactive compounds and biotechnological applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. p. 453-490.

RYAN, R. P. *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, v. 278, n. 1, p. 1-9, Jan. 2008.

SANA, B. Marine microbial enzymes: biotechnological and biomedical aspects. In: KIM, S-K. (ed.). *Marine microbiology: bioactive compounds and biotechnological applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. p. 491-50.

SCHLEPER, C. *et al.* A novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *Journal of Bacteriology*, v. 177, n. 24, p. 7050-7059, Dec. 1995.

SHWETA, S. *et al.* Isolation of endophytic bacteria producing the anti-cancer alkaloid camptothecine from *Miquelia dentata* Bedd. (Icacinaeae). *Phytomedicine*, v. 20, p. 913-917, 2013.

SINGH, M. *et al.* Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 5, p. 1278-1290, Nov. 2015.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, v. 39, p. 321-346, Oct. 1985.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Science*, v. 9, n. 260, p. 214-216, Apr. 1993.

TAECHOWISAN, T.; CHAISAEANG, S.; PHUTDHAWONG, W. S. Antibacterial, antioxidant and anticancer activities of biphenyls from *Streptomyces* sp. BO-07: an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A. *Food Agricultural Immunology*, v. 28, p. 1330-1346, July 2017.

TAKAMI, H. *et al.* Biodiversity in deep-sea near the South part of Japan. *Extremophiles*, v. 3, p. 99-102, May 1999.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Report*, v. 18, p. 448-459, June 2001.

TAWFIKE, A. F. *et al.* Metabolomic tools to assess the chemistry and bioactivity of endophytic *Aspergillus* strain. *Chemistry & Biodiversity*, v. 14, n. 10, p. 1-24, Oct. 2017.

WAKAI, S. Biochemical and thermodynamic analyses of energy conversion in extremophiles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 83, n. 1, p. 49-64, Oct. 2018.

YAYANOS, A. A.; DIETZ, A. S.; VAN BOXTEL, R. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science*, v. 205, n. 4408, p. 808-810, Aug. 1979.

YOGABAANU, U. *et al.* Antimicrobial properties and the influence of temperature on secondary metabolite production in cold environment soil fungi. *Polar Science*, v. 11, p. 60-67, Dec. 2017.

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS

*João Evangelista de Ávila, Francisco Carlos Oliveira,
Francisco das Chagas de Oliveira Freire, Mary Anne Sousa Lima,
Francisco Geraldo Barbosa e Jair Mafezoli*

Introdução

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) ou VOCs (do inglês *volatile organic compounds*) são moléculas de baixo peso molecular (< 300 Da), baixo ponto de ebulição, com alta pressão de vapor, apresentando baixa polaridade e caráter lipofílico. Essas características fazem dos COVs moléculas que possuem fácil volatilização em temperatura ambiente e que desempenham papéis importantes na química biológica de micro-organismos, insetos, plantas, animais e seres humanos (LEMFACK *et al.*, 2016; EFFMERT *et al.*, 2012).

Os COVs produzidos por micro-organismos, insetos e plantas têm por finalidade principal a comunicação química, seja atuando no mecanismo de defesa ou na sinalização entre espécies. Muitas moléculas caracterizadas como COVs apresentam potencial para aplicação biotecnológica e possuem diversas atividades, tais como antimicrobiana, promoção de crescimento de plantas e biocontrole. Os COVs produzidos por plantas, principalmente extraídos na forma de óleos essenciais, caracterizam-se como um recurso importante na química de produtos naturais e já são bastante estudados. Contudo, estudos envolvendo com-

postos orgânicos voláteis produzidos por micro-organismos (mCOVs) ainda são pouco explorados. Dessa forma, neste capítulo, serão abordados os principais aspectos químicos da obtenção e análise de compostos orgânicos voláteis produzidos por micro-organismos, bem como os aspectos biológicos e as potencialidades desses compostos.

Micro-organismos e a produção de COVs

Estima-se que na Terra existam pelo menos um milhão de espécies de micro-organismos, habitando os mais diversos ambientes, sendo encontrados desde o hábitat marinho, nas profundezas dos oceanos, até tecidos de plantas, animais, insetos e em diferentes tipos de solos. Todavia, somente cerca de 10.000 espécies microbianas já foram descritas, e, desse total, apenas um número reduzido de 69 espécies fúngicas e 349 bacterianas foram investigadas com relação à produção de COVs (LEMFACK *et al.*, 2014).

Em relação aos seres humanos, somente nos tecidos da pele, já foram identificadas mais de 1.000 espécies de bactérias (GRICE; SEGRE, 2011). Segundo Collen (2016), somos apenas 10% humanos, uma vez que, para cada célula que compõe nosso corpo, existem nove células de micro-organismos, ocupando diferentes partes do nosso organismo. Estima-se que somente no intestino humano existem aproximadamente 100 trilhões de micro-organismos distribuídos entre cerca de 4 mil espécies (COLLEN, 2016).

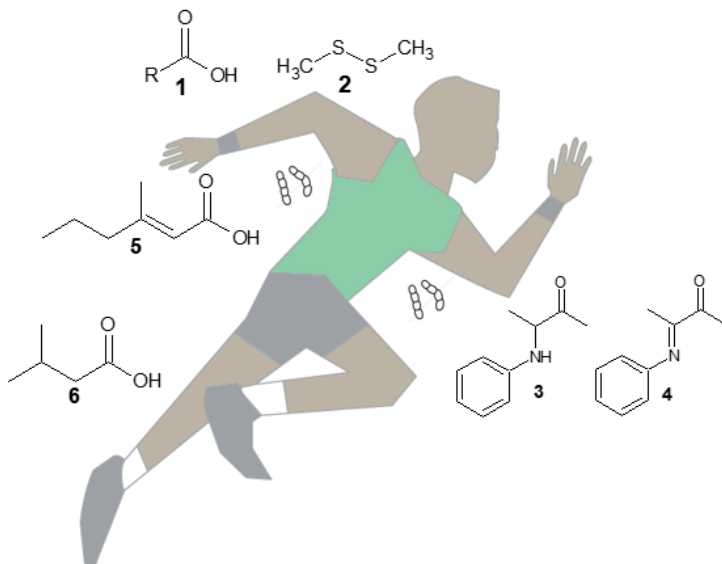
A relação entre micro-organismos e seres humanos se torna bastante perceptível por meio da emissão de compostos orgânicos voláteis. Por exemplo, compostos como os ácidos carboxílicos alifáticos (1) e o dissulfeto de dimetila (2) são produzidos por bactérias que habitam a pele humana e são os principais sinalizadores químicos para os mosquitos localizarem os seres humanos (VERHULST *et al.*, 2011).

Lemfack *et al.* (2016) afirmam que, no estabelecimento da microbiota da pele, uma rede de interações e comunicações interespecíficas mediadas por COVs deve ser considerada. Segundo os autores, que investigaram os perfis de mCOVs de espécies corinebacterianas e estafilocócicas, que são residentes típicas da pele, o perfil de COVs

de *Staphylococcus schleiferi* DSMZ 4807 foi de particular interesse, pois apresentou, principalmente, os COVs 3-(fenilamino)butan-2-ona (**3**) e 3-(fenilimino)butan-2-ona (**4**). Ambos os compostos inibiram o crescimento de várias espécies de bactérias Gram-positivas e são candidatos interessantes para investigações de como os COVs emitidos pelas bactérias da pele influenciam e modulam a microbiota local (LEMFACK *et al.*, 2016).

As corinobactérias também produzem o ácido (*E*)-3-metil-hex-2-enoico (**5**), responsável pelo odor fétido nas axilas, e as bactérias *epidermidis* degradam a leucina no suor humano para produzir o ácido 3-metilbutanoico (**6**), que causa o odor desagradável nos pés (Figura 1) (ZENG *et al.*, 1991; ARA *et al.*, 2006).

Figura 1 – Exemplos de alguns mCOVs produzidos por micro-organismos (bactérias) que habitam o organismo humano



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Apesar de os micro-organismos habitarem os mais diversos ambientes, nota-se que o solo é o hábitat onde são encontrados em maior quantidade e onde os mCOVs desempenham papeis importantes. O

famoso “odor de terra molhada” ou “cheiro de chuva” é ocasionado pelo composto geosmina (**7**) (Figura 2), que é um metabólito microbiano volátil produzido por um número significativo de micro-organismos, incluindo, em sua maioria, bactérias *Streptomyces* e várias espécies de cianobactérias, mixobactérias e fungos (JIANG; HE; CANE, 2007). A geosmina também é responsável pelo “gosto de terra” presente na beterraba. Além disso, sua presença, juntamente com o COV 2-metilisoborneol (**8**) (Figura 2), no ambiente aquático leva a uma absorção por difusão pelos tecidos dos peixes, causando um “gosto de terra” em peixes (SOUZA; MATHIES; FIORAVANZO, 2012).

A detecção humana do COV geosmina (**7**) tem um limiar excepcionalmente baixo de menos de 10 partes por trilhão e tem uma importância econômica considerável devido à sua associação com mofo ou *off-flavors* indesejáveis presentes na água potável, vinhos, peixes e outros gêneros alimentícios (JIANG; HE; CANE, 2007).

Na rizosfera, que é a região onde as raízes das plantas estão em contato com o solo, sendo, portanto, um ambiente rico em nutrientes, os micro-organismos estabelecem suas colônias e desenvolvem uma relação simbiótica, mutualista ou antagonista com uma participação importante dos COVs. Com isso, boa parte dos estudos envolvendo mCOVs estão voltados para o campo agrônômico, principalmente, na investigação da comunicação química entre espécies (LENC; KWAŚNA; SADOWSKI, 2011).

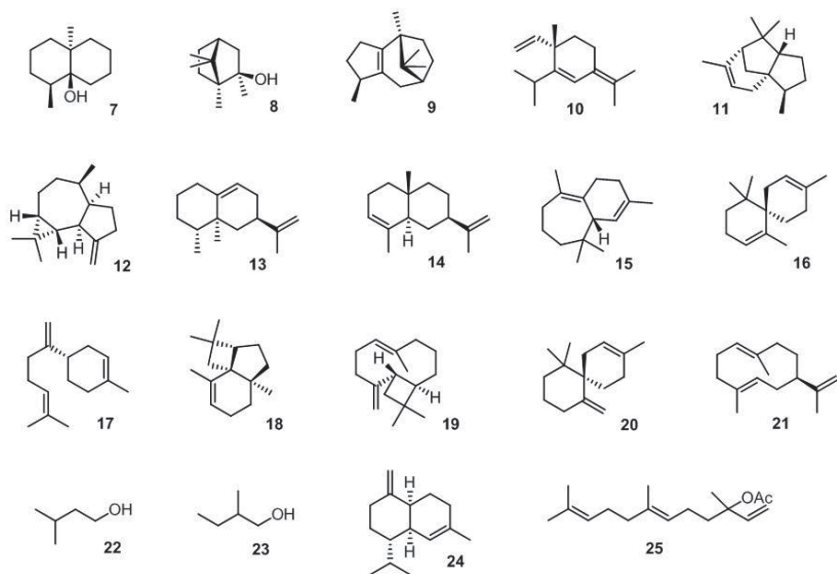
A análise dos COVs microbianos (mCOVs) como uma assinatura ou impressão digital se mostra uma ferramenta útil, já sendo utilizada, atualmente, como marcador para detectar doenças humanas, deterioração de alimentos ou como ferramenta quimiotaixonômica (LEMFACK *et al.*, 2014).

Considerando-se especificamente os fungos, que podem ser encontrados em quase todos os tipos de hábitat, competindo com outros inúmeros organismos, percebe-se uma sofisticada rede de estratégias de proteção e comunicação envolvendo os mCOVs em interações com bactérias, outros fungos, insetos e plantas. Os fungos podem produzir diferentes tipos de COVs, compreendendo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, ésteres, cetonas, aldeídos, álcoois e mono-, sesqui- e diterpenos. Contudo,

os COVs sesquiterpênicos se destacam como marcadores de funções ecológicas específicas dos fungos (KRAMER; ABRAHAM, 2012).

No gênero *Penicillium*, muitas cepas são identificadas por cheiros característicos, e vários sesquiterpenos foram detectados como metabólitos secundários voláteis. Por exemplo, temos para o *Penicillium roqueforti*, usado para produzir o famoso queijo Roquefort, a identificação de diversos COVs sesquiterpênicos com uma variação de esqueletos carbônicos significativa. Entre os COVs sesquiterpênicos de *P. roqueforti* estão: β -patchouleno (**9**), β -elemeno (**10**), diepi- α -cedreno (**11**), β -gurjuneno (**12**), aristolocheno (**13**), α -selineno (**14**), β -hima-chaleno (**15**), α -chamigreno (**16**), β -bisaboleno (**17**), α -panasinseno (**18**), cariofileno (**19**), β -chamigreno (**20**) e germacreno A (**21**) (Figura 2) (JELEN, 2002; DEMYTTENAERE; MORINA; SANDRA, 2003; KRAMER; ABRAHAM, 2012).

Figura 2 – Estruturas químicas de alguns mCOVs produzidos por micro-organismos



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Sahgal e Magan (2008) avaliaram o potencial de um nariz eletrônico (*e-nose*), baseado na detecção de mCOVs, para discriminar e identificar cepas de fungos dermatofíticos causadores de infecções em humanos e animais. Conforme os autores, com base na análise dos mCOVs, foram estabelecidas impressões digitais voláteis de uma espécie de *Microsporum* e duas espécies de *Trichophyton*, sugerindo o uso dessa ferramenta analítica no diagnóstico e tratamento precoce de pacientes contaminados por fungos dermatófitos.

Os perfis de mCOVs de oito espécies fúngicas, incluindo nove linhagens (quatro ectomicorrízicas, três patogênicas e duas saprófitas), foram investigados com o objetivo de se estabelecerem padrões para uma ferramenta de quimiotipagem. Os mCOVs foram coletados por *headspace*, utilizando o método de extração por sorção em barra de agitação e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), possibilitando a identificação de 54 COVs. As análises de componente principal (PCA) e de agrupamentos (HCA) revelaram que as espécies de fungos diferem em seus perfis de COVs, particularmente no padrão de sesquiterpenos, indicando a viabilidade da ferramenta de quimiotipagem para a identificação não invasiva desses micro-organismos (MÜLLER *et al.*, 2013).

Oliveira *et al.* (2015) investigaram os COVs produzidos por fungos endofíticos como uma ferramenta quimiotaxonômica para discriminação de dez espécies de fungos da família *Botryosphaeriaceae*: *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. citricola*, *L. gounubiensis*, *L. parva*, *Neofusicoccum cordaticola*, *N. parvum*, *N. ribis*, *Botryosphaeria mamane* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. Todos os fungos estudados foram isolados de plantas dispersas no bioma Caatinga do estado do Ceará e depositados no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical – CNPAT.

De acordo com o estudo, os fungos endofíticos da família *Botryosphaeriaceae* foram cultivados sob as mesmas condições padronizadas e tiveram os COVs extraídos por HS-SPME e analisados por CG-EM. Trinta e quatro COVs foram identificados, sendo a maioria sesquiterpenos (14 não oxigenados e 10 oxigenados), além

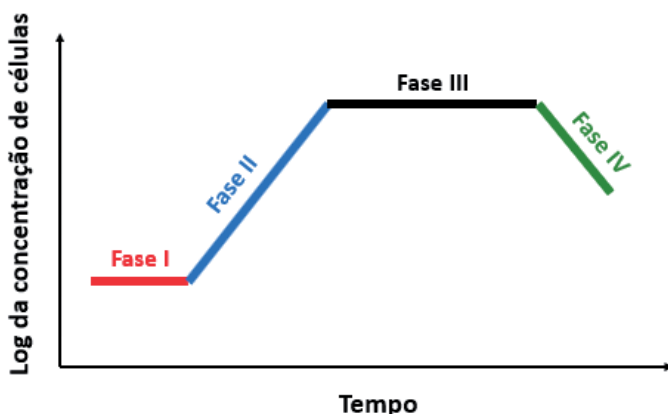
de duas cetonas lineares e oito álcoois. Análise multivariada de dados (PCA e HCA) possibilitou a discriminação de todas as espécies investigadas, mostrando-se eficiente, inclusive, para a diferenciação das espécies *Neofusicocum parvum* e *N. ribis*, que são muito similares e difíceis de ser diferenciadas até mesmo por biologia molecular (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Em outro estudo, Oliveira *et al.* (2017) investigaram os COVs produzidos pelo fungo fitopatógeno *Albonectria rigidiuscula* em diferentes condições de cultivo. Nesse estudo, 44 COVs foram obtidos por HS-SPME, analisados por CG-EM e identificados em diferentes meios de cultura e diferentes períodos de incubação. De acordo com o estudo, a maior produção de COVs ocorreu em meio sólido de arroz e em 14 dias de incubação. Os compostos 3-metilbutan-1-ol (**22**), 2-metilbutan-1-ol (**23**), γ -muuroleno (**24**) e acetato de nerolidol (**25**) (Figura 2) foram produzidos como COVs, por *A. rigidiuscula*, em todas as condições de cultivo. O composto γ -muuroleno (**24**) foi identificado como o constituinte principal (40,78%; 26,24%; e 27,04%) em meio BD (batata dextrose) e foi sugerido como um marcador químico para esse fungo. O uso de análise de dados multivariada (PCA e HCA) permitiu a discriminação dos perfis químicos voláteis de acordo com o meio de cultura (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Aspectos biológicos na obtenção de mCOVs

A emissão de compostos voláteis por micro-organismos está diretamente associada ao número de células, ou seja, ao aumento da colônia presente no ambiente, e ao tempo de cultivo. A partir da concentração inicial (I), as células começam a se multiplicar numa escala exponencial (II) até atingir a fase máxima de crescimento, seguida de uma fase estacionária (III) (Figura 3). É na fase III que se observa a maior quantidade de mCOVs produzidos, devido ao maior número de células vivas presente no sistema. No final do processo, as células entram na fase de decaimento (IV).

Figura 3 – Curva geral de crescimento de um micro-organismo



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Portanto, para obter os COVs de um micro-organismo em particular, faz-se necessário conhecer o seu metabolismo, pois cada espécie possui um sistema biológico diferente. Por exemplo, a produção de COVs por espécies fúngicas ocorre através de mecanismos diversificados em função das diferentes fontes de carbono ou nitrogênio. Já as bactérias se proliferam mais rápido que os fungos filamentosos e, com isso, irão possuir tempos de coletas diferentes (BAGO *et al.*, 1999; MISZTAL *et al.*, 2018).

De forma geral, o perfil dos COVs emitidos por um micro-organismo é consequência de atividades metabólicas específicas, sendo que a composição quantitativa e qualitativa pode ser variável, dependendo das condições de cultivo, tais como temperatura, pH, fonte de carbono, disponibilidade de oxigênio, idade da cultura, entre outras (LEMFAK *et al.*, 2014; KAI *et al.*, 2007; COSTELLO *et al.*, 2014).

Dentro desse contexto, é importante enfatizar os cuidados necessários nas etapas de inoculação e cultivo dos micro-organismos, pois, para a análise dos mCOVs produzidos, o processo deve ser realizado em replicatas (geralmente, triplicatas). O cultivo pode ser feito em frascos (*vials*) e deve gerar resultados semelhantes entre si. Assim, a análise do conjunto de dados obtidos pode inferir, com maior probabilidade, que o micro-organismo está emitindo determinado tipo de COVs.

Para obtenção desses dados, torna-se necessário o planejamento experimental antes do cultivo. Para um bom planejamento experimental, deve-se realizar uma triagem das variáveis, descartando-se as não significativas ou de pouca influência. Para isso, pode-se utilizar o planejamento fatorial fracionário, o qual pode analisar dezenas de fatores de uma única vez. Após a seleção dos fatores significativos, o próximo passo é verificar quantitativamente sua influência sobre a resposta de interesse, bem como as possíveis interações dos fatores entre si (BARROS NETO; ACARMINIO; BRUNS, 2010).

Ainda com relação ao cultivo de micro-organismos para obtenção de COVs, um cuidado importante que se deve ter é com o cálculo da quantidade de meio de cultura em cada frasco e com a concentração da suspensão de esporos, no caso dos micro-organismos filamentosos, ou concentração ajustada de células. Esses cuidados podem minimizar as possíveis diferenças entre os dados obtidos nas replicatas durante as análises dos voláteis. Após serem determinados os padrões de crescimento do micro-organismo, na etapa seguinte, realiza-se a coleta dos voláteis (OLIVEIRA *et al.*, 2017; MISZTAL *et al.*, 2018).

Extração e análise de mCOVs

A principal técnica utilizada para captura dos mCOVs é a microextração em fase sólida (MEFS ou SPME, do inglês *solid phase microextraction*). O processo de extração por SPME ocorre em pequena escala. O meio de cultura e o micro-organismo são colocados em *vials* selados e vedados, normalmente de 40 mL, onde o analito é concentrado. As fibras se encontram alocadas em sistemas de seringas não pontiagudas, ocas, dentro das quais se localiza um bastão de fibra óptica.







O dispositivo de MEFS que contém o bastão de fibra óptica é composto de sílica fundida de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero, que pode ser polidimetilsiloxano (PDMS, apolar, espessuras: 7, 30 e 100 mm), poliacrilato (PA, polar, espessura: 85 mm), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB, espessuras: 60 e 65 mm), carboxen-PDMS (CAR-PDMS, espessura: 75 mm), carbowax-DVB (CW-DVB, espessura: 65 mm), carbowax-resina, TPR-100 suportada (CW-TRP, polar, espessura

50 mm), divinilbenzeno-CAR-PDMS (DVB/CAR/PDMS, espessuras: 30 e 50 mm), CBW-polietileno glicol (CBW-PEG, polar), carbopack Z e um sólido adsorvente (por exemplo, carvão ativo microparticulado = carboxen) (Figura 4) (VALENTE; AUGUSTO, 2000; QUEIROZ, 2009).

Os padrões de fibras comerciais são diferenciados por cores. Na Tabela 1, estão especificadas algumas das fibras que são mais utilizadas em estudos de voláteis e que estão disponíveis no mercado. Para cada tipo de amostra, será necessário otimizar o experimento para determinar o tipo de fibra ideal a ser empregada (VALENTE; AUGUSTO, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2017; MISZTAL *et al.*, 2018).

No procedimento de extração por MEFS, a amostra encontra-se confinada em um frasco com tampa rosqueada e septo, a uma dada temperatura. Com a fibra recolhida no interior da agulha do dispositivo de MEFS, o septo do frasco é perfurado, e, com o movimento do êmbolo do dispositivo de MEFS, a fibra é exposta no interior da amostra ou no *headspace* (HS) do frasco. Após a extração, com a obtenção do equilíbrio de partição do soluto entre as fases, a fibra é novamente retraída para o interior da agulha do dispositivo de MEFS. É importante salientar que as fibras são frágeis e devem ser manipuladas com atenção (VALENTE; AUGUSTO, 2000; QUEIROZ, 2009).

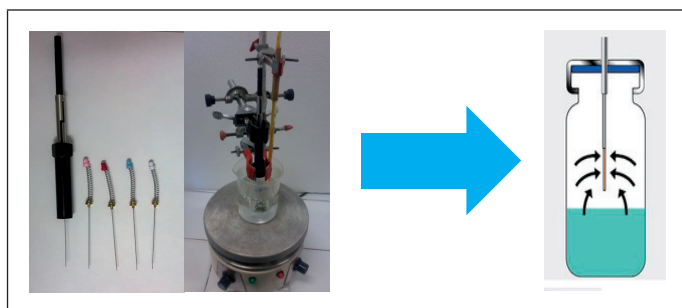
Tabela 1 – Tipos de fibra para análises de mCOVs por SPME

Tipos de composto (Faixa de massa molar)	Fibra utilizada (SPME)	Cor
Voláteis apolares (MM = 60-275)	Polydimethylsiloxane (PDMS)	
Compostos odoríficos (MM = 40-275)	Divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS)	
Baixa polaridade (MM = 30-225)	Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)	
Voláteis, aminas e compostos nitroaromáticos (MM = 50-300)	Polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB)	
Semivoláteis polares (MM = 80-300)	Polyacrylate (PA)	
Voláteis polares	Carbowax-polyethylene glycol (PEG)	

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog>.

A coleta dos mCOVs por microextração em fase sólida ocorre em modo *headspace* (HS-MEFS). Nesse caso, após a fibra ser inserida no *vial*, ocorre um processo cinético e termodinâmico de adsorção. Nesse processo, os mCOVs são adsorvidos por afinidade química pelo revestimento da fibra até alcançarem o equilíbrio. Dois fatores são importantes para que ocorra o equilíbrio: a temperatura de extração e o tempo de exposição da fibra (VALENTE; AUGUSTO, 2000). Geralmente, para realizar as análises dos voláteis de um determinado micro-organismo por HS-MEFS, será necessário otimizar, além do tipo de fibra, a temperatura do sistema e o tempo de exposição da fibra (Figura 4).

Figura 4 – Fibras utilizadas em SPME e sistema de captura dos mCOVs no modo *headspace* (HS-SPME)

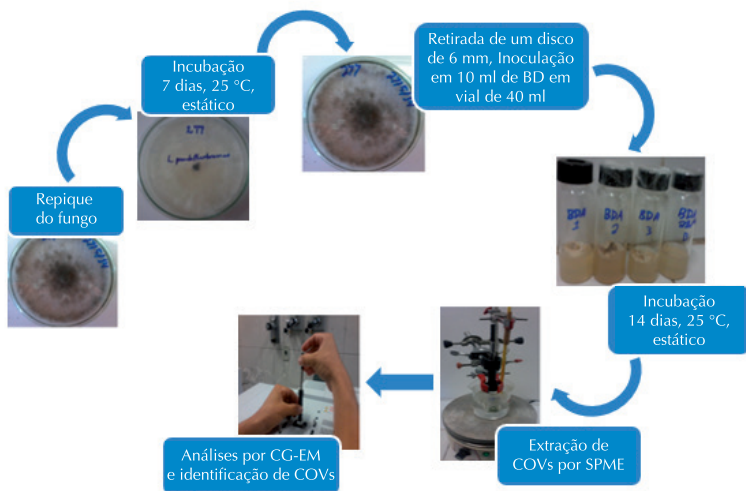


Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Após a extração por HS-SPME, os mCOVs podem ser analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Nessa técnica, a análise inicia-se pela inserção da fibra no injetor do cromatógrafo, onde ocorre a dessorção térmica dos mCOVs da fibra. Em seguida, os mCOVs são conduzidos por um gás de arraste (normalmente, hélio) para uma coluna capilar onde são separados em relação ao tamanho, polaridade, volatilidade e outras características, de acordo com o tipo de coluna utilizada. Após a separação cromatográfica, os compostos chegam à fonte de ionização do espectrômetro de massas. Nessa etapa, os compostos são ionizados e fragmentados, resultando em um número de íons com diferentes razões *massa/carga* (m/z), os quais são detectados e transformados em sinais digitalizados. Por fim,

um *software* constrói o espectro de massas da substância (Figura 5). A fragmentação de cada molécula é única, sendo, dessa forma, usada como impressão digital química para sua caracterização.

Figura 5 – Metodologia geral de obtenção e análise de mCOVs



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Dessa forma, se o composto já foi isolado e caracterizado em outros estudos já publicados, é bem provável que o espectro de massas esteja registrado em bancos de dados. Existem diversos bancos de dados que possibilitam o acesso e a comparação dos espectros de fragmentação de massas. Entre estes, podem-se citar:

- NIST webBook (<https://webbook.nist.gov/>)
- The Pherobase (<http://www.pherobase.com/>)
- mVOCs 2.0 (<http://bioinformatics.charite.de/mvoc/index.php>)
- GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>)

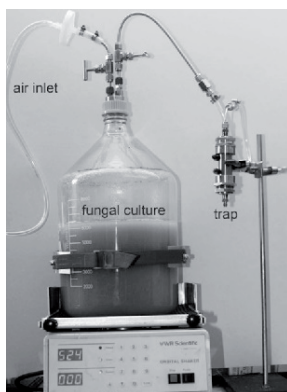
Devido à sua grande abrangência, a biblioteca NIST é, normalmente, a referência utilizada para a identificação de mCOVs. Além da comparação da similaridade dos espectros de fragmentação de massas, outro dado importante que deve ser utilizado é o índice de retenção

de Kovats (VAN DEN DOOL, 1963). O valor do índice de retenção é calculado para cada componente volátil e comparado a um valor padrão encontrado na literatura (margem de erro de até 15%), o qual varia de acordo com o tipo de coluna utilizada.

Para um composto orgânico volátil estar registrado em uma biblioteca, primeiramente, ele deve ser isolado, caracterizado e ter definidas suas propriedades físicas e químicas. Esse processo é possível a partir da obtenção de óleo essencial de plantas, que permite isolar e caracterizar compostos de baixa massa molecular, como é o caso dos voláteis. Não é de se estranhar que os COVs produzidos por plantas sejam, em muitos casos, iguais aos produzidos por micro-organismos, uma vez que as duas espécies vivem em associação, e uma influencia diretamente no metabolismo da outra (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Ainda não existe uma técnica consolidada para isolamento e purificação de voláteis de micro-organismos por cromatografia usual. Uma técnica desenvolvida por Booth *et al.* (2011) permite capturar miligramas de mCOVs, chamada *carbotraps*. Essa técnica consiste em encubar o micro-organismo em um sistema fechado que permite uma vazão de gases por uma tubulação até uma coluna de aço inoxidável recheada com xisto de bentonita. Nessa coluna, os gases são aprisionados e recuperados por aquecimento controlado, sendo conduzidos para uma armadilha com nitrogênio líquido, para garantir a mudança de estado da matéria (Figura 6).

Figura 6 – Sistema *carbotraps* de cultivo e coleta de mVOCs



Fonte: Booth *et al.* (2011).

Considerando-se a complexidade dos COVs produzidos por micro-organismos, em sua análise, faz-se necessária a utilização de métodos quimiométricos para o tratamento dos dados obtidos. Com isso, o uso de técnicas de análise multivariada de dados permite avaliar as diferenças entre conjuntos de amostras complexas. Nesse contexto, as técnicas de análise de componente principal (ACP ou PCA, do inglês *principal component analysis*) e análise de agrupamento hierárquico (AAH ou HCA, do inglês *hierarchical cluster analysis*) se mostram adequadas para estudos com dados de COVs gerados por análises de CG-EM (PÉREZ SABINO; MÉRIDA REYES; FARFÁN BARRERA, 2012).

Potencial biotecnológico dos mCOVs: promoção do crescimento de plantas, atividade antimicrobiana e biocombustíveis

As potencialidades dos compostos orgânicos voláteis produzidos por micro-organismos ainda estão muito restritas ao campo agrônômico. Na literatura, é possível encontrar diversos estudos relatando os efeitos dos mCOVs como promotores do crescimento de plantas e inibidores de patógenos. Essas são as principais aplicações porque, de certa forma, não é necessário isolar cada constituinte para testá-lo puro.

Para comprovar a atividade de um composto volátil, é necessário identificá-lo e comparar a sua eficiência com a de um padrão puro. Portanto, torna-se um grande desafio comprovar as atividades dos mCOVs, visto que, geralmente, nas análises de voláteis, são identificadas dezenas de compostos e, em vários casos, muitas das substâncias ainda não estão registradas nos bancos de dados.

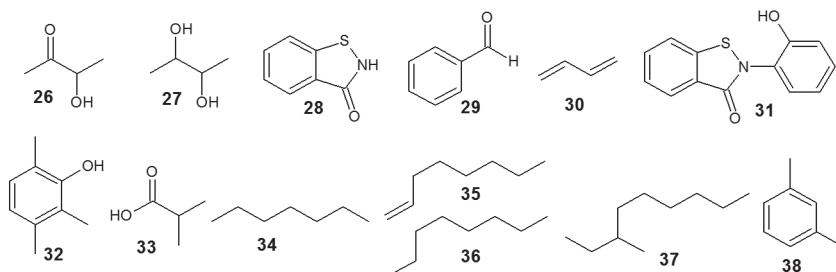
Os mCOVs promotores do crescimento de plantas, geralmente, são produzidos por bactérias que colonizam a rizosfera. Os gêneros *Bacillus*, *Stafilococcus* e *Serratia* produzem os COVs 3-hidroxiбутан-2-ona (26) e бутан-2,3-диол (27) (Figura 7), que promovem o crescimento de plantas colonizadas, assim como o desenvolvimento das raízes (FINCHEIRA *et al.*, 2016; FARAG *et al.*, 2006).

Outra potencialidade biotecnológica dos mCOVs bastante descrita na literatura é a atividade antimicrobiana, como é o caso dos COVs

1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona (**28**), benzaldeído (**29**) e o buta-1,3-dieno (**30**), que foram identificados em espécies de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 e *B. artrophaeus* LSSC22. Esses compostos inibiram 100% o crescimento de *Ralstonia solanacearum* TBBS1, uma bactéria fitopatogênica que causa doenças nas plantações de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (TAHIR *et al.*, 2017).

Os compostos benzotiazol (**31**) e 2,3,6-trimetilfenol (**32**) (Figura 7) inibiram completamente o crescimento do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, que é o fungo causador de doenças na bananeira (YUAN *et al.*, 2012). Além disso, o mCOV ácido isobutírico (**33**) (Figura 7), isolado da espécie *Muscodor crispans*, inibiu completamente a proliferação de patógenos humanos, como a *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* (MITCHELL *et al.*, 2010).

Figura 7 – Estruturas de mVOCs com potencial biotecnológico



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Outra característica apresentada pelos micro-organismos é a produção de COVs do tipo hidrocarbonetos. Várias espécies, principalmente fungos endofíticos, possuem um arsenal enzimático capaz de degradar a biomassa de plantas mortas e produzir moléculas com potencial energético (STROBEL *et al.*, 2011). Espécies como *Ascocoryne sarcoides*, *Ascocoryne cilichium* e *Ascocoryne solitaria* são exemplos de endofíticos que produzem mCOVs com características de biocombustíveis (GRIFFIN *et al.*, 2010). O *Gliocladium roseum* produz mCOVs como heptano (**34**), oct-1-eno (**35**), octano (**36**), 3-metilnonano (**37**) e *m*-xileno (**38**) (Figura 7). Todos esses hidrocarbonetos são compostos com potencial de produção energética (AHAMED; AHRING, 2011).

Obviamente, devido a dificuldades na obtenção dos mVOCs na forma pura e devido à quantidade mínima de compostos produzidos, todas essas vantagens ainda estão no campo das potencialidades. Talvez, no futuro próximo, tenhamos como aproveitar e aplicar essas potencialidades biotecnológicas. Porém, a aplicação desses mCOVs na agricultura já é uma realidade, sendo vários micro-organismos utilizados como agentes de biocontrole nas plantações de pequeno porte, principalmente na agricultura orgânica, evitando, assim, a utilização de agrotóxicos.

Referências

AHAMED, A.; AHRING, B. K. Production of hydrocarbon compounds by endophytic fungi *Gliocladium* species grown on cellulose. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 20, p. 9718-9722, 2011.

ARA, K. *et al.* Foot odor due to microbial metabolism and its control. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 357-364, 2006.

BAGO, B. *et al.* Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology*, v. 121, p. 263-271, 1999.

BARROS NETO, B.; ACARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BOOTH, E. *et al.* A rapid column technique for trapping and collecting of volatile fungal hydrocarbons and hydrocarbon derivatives. *Biotechnology Letters*, v. 33, n. 10, p. 1963-1972, 2011.

COLLEN, A. *10% humano: como os micro-organismos são a chave para a saúde do corpo e da mente*. Tradução Ivo Korytowski. Rio de Janeiro: Sextante, 2016. 287 p.

COSTELLO, B. L. *et al.* A review of the volatiles from the healthy human body. *Journal of Breath Research*, v. 8, p. 1-29, 2014.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; MORINA, R. M.; SANDRA, P. Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. *Journal of Chromatography A*, v. 985, p. 127-135, 2003.

EFFMERT, U. *et al.* Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, n. 6, p. 665-703, 2012.

FARAG, M. A. *et al.* GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, v. 67, n. 20, p. 2262-2268, 2006.

FINCHEIRA, P. *et al.* Growth promotion of *Lactuca sativa* in response to volatile organic compounds emitted from diverse bacterial species. *Microbiological Research*, v. 193, p. 39-47, 2016.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 244-253, 2011.

GRIFFIN, M. A. *et al.* Volatile organic compound production by organisms in the genus *Ascocoryne* and a re-evaluation of myco-diesel production by NRRL 50072. *Microbiology*, v. 156, n. 12, p. 3814-3829, 2010.

JELLEN, H. H. Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6569-6574, 2002.

JIANG, J.; HE, X.; CANE, D. E. Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature Chemical Biology*, v. 3, n. 11, p. 711-715, 2007.

KAI, M. *et al.* Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, v. 187, p. 351-360, 2007.

KRAMER, R.; ABRAHAM, W. R. Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for? *Phytochemistry Review*, v. 11, p. 15-37, 2012.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

LEMFACK, M. C. *et al.* mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, v. 42, p. 744-748, 2014.

LEMFACK, M. C. *et al.* Novel volatiles of skin-borne bacteria inhibit the growth of Gram-positive bacteria and affect quorum-sensing controlled phenotypes of Gram-negative bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 39, n. 8, p. 503-515, 2016.

LENC, L.; KWAŚNA, H.; SADOWSKI, C. Dynamics of the root/soil pathogens and antagonists in organic and integrated production of potato. *European Journal of Plant Pathology*, v. 131, n. 4, p. 603-620, 2011.

MISZTAL, P. K. *et al.* Emission factors of microbial volatile organic compounds from environmental bacteria and fungi. *Environmental Science & Technology*, v. 52, n. 15, p. 8272-8282, 2018.

MITCHELL, A. M. *et al.* Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, v. 156, n. 1, p. 270-277, 2010.

MÜLLER, A. *et al.* Volatile profiles of fungi: chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology*, v. 54, p. 25-33, 2013.

OLIVEIRA, F. C. *et al.* Perfil dos componentes voláteis produzidos pelo fungo fitopatôgeno *albonectria rigidiuscula* em diferentes condições de cultivo. *Química Nova*, v. 40, n. 8, p. 890-894, 2017.

OLIVEIRA, F. C. *et al.* Volatile organic compounds from filamentous fungi: a chemotaxonomic tool of the Botryosphaeriaceae family. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 11, p. 2189-2194, 2015.

PÉREZ SABINO, J. F.; MÉRIDA REYES, M.; FARFÁN BARRERA, C. D. Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-EM e análise multivariada. *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 97-101, 2012.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 3, p. 11-19, 2009.

SAHGAL, N.; MAGAN, N. Fungal volatile fingerprints: discrimination between dermatophyte species and strains by means of an electronic nose. *Sensors and Actuators B*, v. 131, p. 117-120, 2008.

SOUZA, S. M. G.; MATHIES, V. D.; FIORAVANZO, R. F. Off-flavor por geosmina e 2-metilisborneol na aquicultura. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 2, p. 835-846, 2012.

STROBEL, G. *et al.* An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiology Letters*, v. 320, n. 2, p. 87-94, 2011.

TAHIR, H. A. S. *et al.* *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Scientific Reports*, v. 7, 2017.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração em fase sólida. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 11, p. 463-467, 1963.

VERHULST, N. O. *et al.* Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. *PloS one*, v. 6, n. 12, p. e28991, 2011.

YUAN, J. *et al.* Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 16, p. 5942-5944, 2012.

ZENG, X. N. *et al.* Analysis of characteristic odors from human male axillae. *Journal of Chemical Ecology*, v. 17, n. 7, p. 1469-1492, 1991.

MICOTOXINAS: os metabólitos tóxicos dos fungos

Debora Bezerra de Sousa e Mary Anne Sousa Lima

Introdução

A história antiga relata vários eventos relacionados a doenças causadas por ingestão de alimentos contaminados por fungos. Entre estes, duas doenças foram particularmente devastadoras: o ergotismo, uma doença epidêmica que acometeu a Europa na Idade Média, sendo relacionada ao consumo de cereais contaminados por *Claviceps purpurea*; e a ATA (aleucia alimentar tóxica), que matou cerca de 100 mil russos durante a Segunda Guerra Mundial e foi atribuída à ingestão de grãos contaminados por *Fusarium sporotrichioides* e *Fusarium poae* (BENNETT; KLICH, 2003; LIEW; MOHD-REDZWAN, 2018).

No entanto, a associação de substâncias tóxicas produzidas por fungos e algumas doenças só se iniciou em 1960, quando um surto de mortes repentinas, conhecido como “turkey x disease”, que vitimou cerca de 100.000 aves no Reino Unido, especialmente perus, e se difundiu para outras espécies de aves por casos similares em todo o mundo. Após uma investigação científica, chegou-se à conclusão de que a causa das mortandades era proveniente da ingestão da ração feita com amendoim importado da África e do Brasil. Os grãos estavam contaminados com substâncias hepatotóxicas que foram isoladas do fungo *Aspergillus flavus*, o qual possuía recorrente presença como contaminante nas amostras analisadas. As substâncias fúngicas mostraram

propriedades fluorescentes com diferentes colorações sobre radiação ultravioleta e foram denominadas de aflatoxinas, devido à junção dos termos *Aspergillus flavus* e toxina (FREIRE; SANT'ANA, 2018).

Pesquisas posteriores revelaram que, além de *A. flavus*, outras espécies de fungos também eram capazes de biossintetizar as aflatoxinas, assim como outros metabólitos secundários com extrema toxicidade. A partir de então, o termo aflatoxina foi substituído por um conceito mais amplo denominado de micotoxina [*mykes* (do grego, fungo) e *toxicum* (do latim, toxina)], como sinônimo de qualquer substância fúngica associada com produtos alimentícios capazes de induzir uma resposta tóxica quando ingerida por animais, incluindo os seres humanos (ISMAIEL; PAPENBROCK, 2015), diferenciando-se das toxinas bacterianas por não terem natureza proteica e nem serem imunogênicas. No entanto, atualmente, nem todos os metabólitos secundários tóxicos de origem fúngica são considerados micotoxinas, pois, para tal, deve-se considerar o alvo de ação do metabólito e a sua concentração tóxica (BENNETT; KLICH, 2003).

Os fungos e a produção de micotoxinas

Os fungos produtores de micotoxinas são, geralmente, endofíticos e fitopatógenos, que colonizam o interior dos tecidos vegetais onde desenvolvem uma relação de parasitismo e lançam seus metabólitos tóxicos provocando o aparecimento de doenças. Pouco se conhece sobre como se processa o mecanismo de ação desses metabólitos nas células vegetais, e muitos estudos ainda estão sendo realizados a fim de elucidar tais mecanismos (ISMAIEL; PAPENBROCK, 2015). A capacidade de biossíntese de micotoxinas por algumas espécies de fungos os deixa em vantagem em relação a outros micro-organismos, uma vez que tais compostos, apesar de não serem essenciais à sua sobrevivência, podem apresentar níveis diversos de toxicidade para outros seres, inclusive predadores. Esses efeitos tóxicos causam danos relacionados à ruptura da membrana celular e interferência em processos vitais, como no caso da síntese de DNA.

As micotoxinas são biossintetizadas quando os fungos são submetidos a condições que favoreçam a produção desses metabólitos

secundários (OTTONI, 2008), como o uso de agroquímicos (fungicidas), condições ambientais (temperatura, armazenamento e umidade) e biológicas (susceptibilidade do hospedeiro e virulência do patógeno) (MELO, 2014). Outros fatores, como o estresse hídrico e a baixa absorção de nutrientes, também favorecem o ataque de fitopatógenos produtores de micotoxinas devido à redução da imunidade da planta. Além disso, as condições geográficas e climáticas são determinantes para a presença de patógenos nas lavouras e, conseqüentemente, para a biossíntese de compostos tóxicos (MORETTI, 2017). Por exemplo, os tricotecenos, biossintetizados especialmente por espécies do gênero *Fusarium*, são produzidos sob condições de elevada umidade e temperaturas entre 6 e 24 °C (ZAIN, 2011), enquanto que as zearalenonas são produzidas pelo cultivo do fungo por um período de 3 semanas com umidade acima de 20% e temperaturas entre 20 e 25 °C (BOEIRA, 2012).

Efeitos toxicológicos, fontes naturais e diversidade química das micotoxinas

Micotoxinas podem ser moléculas pequenas e estruturalmente simples, ou de alta complexidade com elevado peso molecular (superior a 500 Daltons). Esses compostos são produzidos por meio de diferentes rotas biossintéticas e, portanto, são distribuídos em uma ampla variedade de classes de produtos naturais. Apesar de relatos da identificação de mais de 400 micotoxinas, os estudos químicos, agrônômicos e toxicológicos são particularmente direcionados aos metabólitos que apresentam relação direta com a segurança alimentar e perdas econômicas na agricultura (UNUSAN, 2019).

As espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria* estão entre as maiores produtoras de micotoxinas. No entanto, acredita-se que espécies de outros gêneros também são capazes de biossintetizá-las, porém alguns compostos não são identificados devido à baixa concentração nos alimentos ou ainda pela fraca toxicidade aguda em humanos e outros vertebrados (FRISVAD *et al.*, 2006).

A principal fonte de contato dos humanos e animais com as micotoxinas é a alimentação, embora possa se dar também por via dérmica e

por inalação (ZAIN, 2011). Isso se deve ao fato de que as culturas de cereais são as mais acometidas pela presença de fungos toxigênicos e, por essa razão, podem ser contaminadas com os mais diversos tipos de micotoxinas. Os fungos responsáveis pela biossíntese de micotoxinas na agricultura são divididos em dois grupos: aqueles que acometem as plantações antes da colheita (fungos de campo) e aqueles que contaminam após a colheita (fungos de armazenamento). Dessa forma, esses compostos podem ser encontrados em cultivo de cereais, plantas leguminosas e produtos de origem animal processados (TOLA; KEBEDE, 2016) e podem permanecer nos grãos, no campo ou no período pós-colheita. Estudos da FAO (*Food and Agriculture Organization* – Organização para a Alimentação e Agricultura) mostram que cerca de 25% de alimentos e rações estão contaminados por micotoxinas (MORETTI, 2017).

As doenças atribuídas às micotoxinas são chamadas de micotoxicoses (BENNETT; KLICH, 2003), que podem levar à toxicidade aguda ou crônica tanto em humanos quanto em animais (ALSHANNAQ; YU, 2017). No entanto, essas doenças também podem causar graves problemas para plantas, pelo prejuízo do seu desenvolvimento (MORETTI, 2017). Os efeitos das micotoxicoses podem ser agudos ou crônicos, por meio de uma resposta rápida do organismo a partir da ingestão da toxina, ou pelo contato em longos períodos de exposição a baixas doses da toxina (BENNETT; KLICH, 2003). A grande dificuldade em prevenir essas doenças decorre da estabilidade térmica desses compostos, que não permite a sua eliminação dos alimentos mediante etapas de processamento e fervura. Dessa forma, grandes cuidados nas lavouras são requeridos a fim de se reconhecer precocemente a presença de fungos produtores de micotoxinas (MORETTI, 2017).

Os métodos que visam ao controle de micotoxinas incluem boas práticas agrícolas, com prevenção e controle da presença dos patógenos nas lavouras, assim como métodos adequados de armazenamento e secagem no período pós-colheita, além do uso de cultivares de plantas resistentes a patógenos que foram modificadas por processos de engenharia genética (BENNETT; KLICH, 2003).

Os metabólitos secundários considerados mais representativos da classe das micotoxinas são aqueles que causam um maior impacto

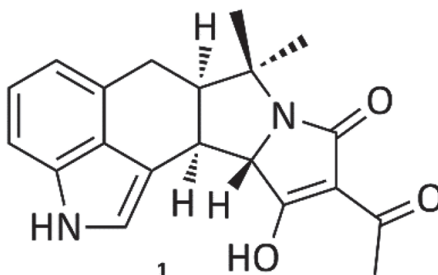
para o setor agrônômico industrial e efeitos toxicológicos severos para a saúde pública. De acordo com a literatura, entre mais de 300 micotoxinas identificadas (BERTHILLER *et al.*, 2007), alguns compostos e seus derivados que possuem efeitos mais devastadores incluem os apresentados a seguir.

Ácido ciclopiazônico (CPA)

O CPA (**1**) (Figura 1) foi inicialmente isolado por Holzapfel em 1968, como o principal metabólito tóxico de culturas de *Penicillium cyclopium* Westling (CSIR 1082) (*Penicillium griseofulvum* Dierckx) isolado de amendoins. Desde então, aproximadamente 27 compostos do tipo CPAs não tóxicos foram relatados a partir de diferentes extratos de fungos encontrados em alimentos, particularmente nos gêneros *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii* e *A. parvisclerotigenus*) e *Penicillium* (*P. griseofulvum*, *P. camemberti*, *P. commune*, *A. flavus*, *A. oryzae* and *A. tamarii*). *P. dipodomyicola* também é considerado um produtor de CPA, porém é raramente encontrado em alimentos (FRISVAD *et al.*, 2006).

O CPA (**1**) é um ácido tetrâmico indólico produzido pelo mecanismo tipo mevalonato, com triptofano e duas moléculas de acetato (OSTRY *et al.*, 2018). Ele é quimicamente relacionado à classe dos alcaloides tipo ergolina e possui uma estreita semelhança estrutural com o ácido lisérgico.

Figura 1 – Estrutura química do CPA (**1**)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

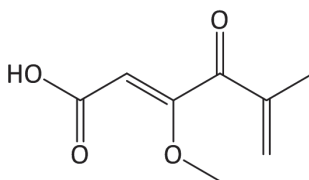
Esse composto ocorre em vários produtos de origem vegetal, particularmente em culturas de oleaginosas, cereais, amendoins, nozes e algumas frutas secas, e ainda a partir de alimentos de origem animal, como queijo, leite e salame (OSTRY *et al.*, 2018).

Dentre os seus efeitos toxicológicos, destaca-se a capacidade de causar a necrose de diversos órgãos internos após a sua ingestão. Dessa forma, essa substância é classificada na categoria de micotoxinas potencialmente graves, pois causa alterações degenerativas e necrose no fígado, baço, rins, glândulas salivares, miocárdio e músculos esqueléticos, com sintomas de perda de peso, diarreia, degeneração e necrose dos músculos e vísceras e convulsão e morte em roedores, cães, porcos e aves (OSTRY *et al.*, 2018).

Ácido penicílico

O ácido penicílico (**2**) (Figura 2), também conhecido como ácido 3-metoxi-5-metil-4-oxo-2,5-hexadienoico, foi isolado pela primeira vez a partir do fungo *Penicillium puberulum*, durante uma investigação sobre a possível relação entre a incidência de pelagra e o processo de deterioração do milho por fungos. Sua estrutura química foi elucidada em 1936, e seu efeito antibacteriano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi reportado logo em seguida (BARKAI-GOLAN, 2008a).

Figura 2 – Estrutura química do ácido penicílico (**2**)



2

Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Vários fungos do gênero *Penicillium* seção *Viridicata* e *Aspergillus* seção *Circumdati*, com ocorrência comum em espécies

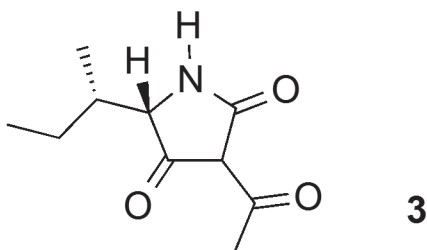
de frutíferas em períodos de pós-colheita, são eficientes produtores do ácido penicílico. O grande número de micro-organismos capazes de sintetizar essa micotoxina indica a onipresença desses organismos na natureza e a possibilidade da presença dessa micotoxina em grãos de alta umidade (BARKAI-GOLAN, 2008a).

O ácido penicílico (2) tem demonstrado efeitos agudos tóxicos em aves, ratos e coelhos, pela dilatação dos vasos sanguíneos e propriedades antidiuréticas. Além disso, esse composto é considerado citotóxico, hepatotóxico, carcinogênico e também possui efeito cardiotoxico, pelo bloqueio dos canais de sódio, potássio e cálcio. A atividade de inibição do crescimento de espécies do gênero *Phytophthora* revela também uma ação fitotóxica para esse composto (BARKAI-GOLAN, 2008a).

Ácido tenuazônico (TeA)

O ácido tenuazônico (TeA) (3) (Figura 3) é um derivado de ácido tetrâmico contendo uma unidade de pirrolidina e foi primeiramente isolado em 1957 a partir de culturas de *Alternaria tenuis*. Desde então, esse composto tem sido especialmente considerado como a micotoxina majoritária de espécies do gênero *Alternaria*, particularmente, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. bertholletius*, *A. caelatus*, *A. nominus*, *A. pseudonominus*, *A. arachidicola* e *A. bombycis*. Porém, ele também possui incidência em algumas espécies dos gêneros *Phoma*, *Magnaporthe* e *Aspergillus* (BARKAI-GOLAN, 2008b; FRISVAD *et al.*, 2006; CHEN; QIANG, 2017).

Figura 3 – Estrutura química do ácido tenuazônico (3)



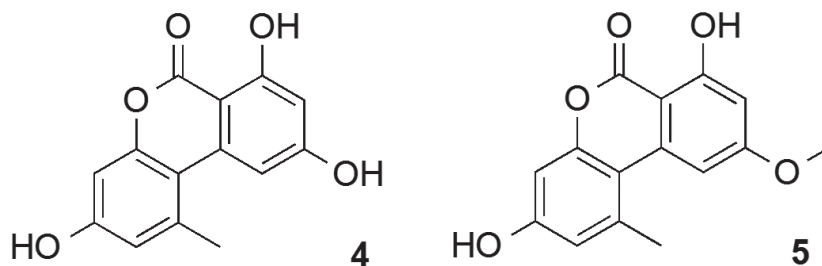
A presença da TeA (**3**) já foi detectada com elevadas concentrações em frutas e vegetais, incluindo tomate, melão, pepino, entre outros (BARKAI-GOLAN, 2008b), e também em sementes de girassol e sorgo, cevada, aveia, arroz, trigo e em vários produtos derivados industrializados, como sucos, vinhos, óleos vegetais, especiarias e comida infantil (PRENDES *et al.*, 2018).

A ingestão dessa micotoxina pode causar taquicardia, hemorragias, vômitos e doenças hematológicas em mamíferos (FRAEYMAN *et al.*, 2017), além de ser associada a mudanças pré-cancerosas na mucosa esofágica de ratos. Apesar dos seus efeitos de toxicidade aguda em humanos e animais, pesquisas científicas relatam que TeA também apresenta propriedades benéficas, destacando-se as atividades antiviral, antibacteriana e antitumoral (NGUYEN *et al.*, 2018).

Alternariol (AOH) e Alternariol monometil éter (AME)

Alternariol (AOH) (**4**) e seu derivado monometil éter (AME) (**5**) (Figura 4) são benzo- α -pironas, descritas pela primeira vez em 1953 (SIEGEL *et al.*, 2010), e são consideradas as micotoxinas mais comumente biossintetizadas por espécies do gênero *Alternaria*.

Figura 4 – Estrutura química de alternariol (AOH) (**4**) e alternariol monometil éter (**5**)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Esses compostos já foram detectados em culturas de cereais, tomate, azeitona, pimenta, melão, framboesa e maçã, além de nozes e semente de girassol, e também em produtos processados como sucos, vinhos, entre outros (MAGAN, 2004; SOLHAUG *et al.*, 2015).

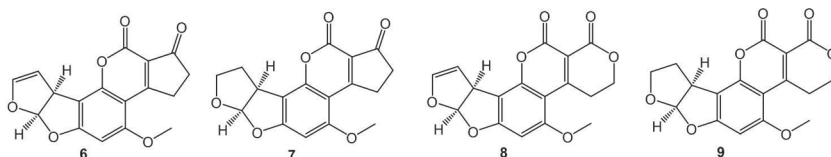
Estudos recentes indicaram efeitos imunossupressores *in vivo* para esses compostos, embora os seus mecanismos de ação ainda não tenham sido desvendados. Acredita-se ainda que o consumo de AOH e AME através de alimentos contaminados esteja associado ao aumento nos casos de câncer de esôfago na China, país onde a incidência dessa micotoxina é bastante elevada. Também há vários estudos na literatura acerca de testes *in vitro* das atividades mutagênicas e genotóxicas dessas micotoxinas em células bacterianas e de mamíferos, porém os dados acerca dessas propriedades *in vivo* ainda são escassos (CABRAL *et al.*, 2016).

Aflatoxinas

As aflatoxinas (Figura 5) foram o primeiro grupo de micotoxinas que tiveram suas estruturas químicas elucidadas. Desde o ano de 1962 até o momento, pelo menos vinte aflatoxinas foram identificadas, entre as quais, as mais importantes são as aflatoxinas do tipo B1 (6), B2 (7), G1 (8) e G2 (9) (KUMAR *et al.*, 2017).

Esses compostos se caracterizam como policetídeos derivados de difuranocoumarinas biossintetizados a partir do acetato como unidade precursora, sendo que a maioria das etapas biossintéticas envolvidas no mecanismo já foi desvendada. A classificação das aflatoxinas se baseia na coloração apresentada após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e exposição à radiação ultravioleta. As aflatoxinas do tipo B apresentam coloração azul (do inglês *blue*), enquanto que as do tipo G apresentam coloração verde (do inglês *green*) (FRISVAD *et al.*, 2006; ZAIN, 2011).

Figura 5 – Estrutura química das aflatoxinas B1 (6), B2 (7), G1 (8) e G2 (9)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

A aflatoxina B1 (AFB1) (6) é o composto mais representativo da classe e é produzida por *Aspergillus flavus*. No entanto, outras espécies de *Aspergillus* também são relatadas por apresentarem a capacidade de produzir aflatoxinas, como *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, *A. toxicarius*, *A. parvisclerotigenus*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii* (FRISVAD *et al.*, 2006). Essas espécies (sobretudo *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. flavus*) se desenvolvem muito bem em diversos tipos de alimentos, plantas (inclusive medicinais) e bebidas (ASHIQ; HUSSAIN; AHMAD, 2014), sendo também comumente encontradas em países tropicais parasitando as culturas de milho, algodão, castanhas e amendoim.

De uma maneira geral, as aflatoxinas possuem propriedades oncogênicas e imunossupressivas e contribuem significativamente como fator de risco no desenvolvimento de câncer hepatocelular. Aves e porcos alimentados com ração contaminada por aflatoxinas possuem, geralmente, problemas de redução da imunidade, levando a sérios problemas econômicos para os produtores (AL-JAAL *et al.*, 2019). Particularmente, a AFB1 é considerada o agente natural mais carcinogênico que se conhece, sendo classificada como carcinógeno humano grupo 1 pela *International Agency of Research on Cancer*. AFB2 (7), AFG1 (8) e AFG2 (9) são menos carcinogênicas e menos mutagênicas que AFB1 (6), provavelmente devido à presença da dupla ligação em C8-C9 na cadeia hidrocarbônica (AL JAAL *et al.*, 2019).

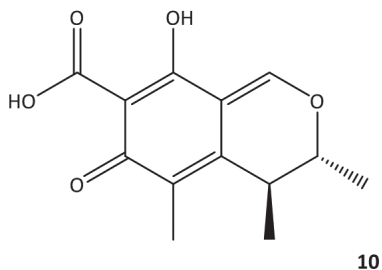
As aflatoxinas são as micotoxinas de maior toxicidade até então relatadas. Estima-se que a sua dose letal aguda para adultos seja entre 10 e 20 μg . Elas manifestam a incrível capacidade de danificar o DNA, causar diversos tipos de câncer em animais e humanos, além de apresentarem efeitos teratogênicos e ocasionarem danos hormonais. Mais de 170 mil casos de câncer de fígado são relatados por ano e são atribuídos ao consumo dessas micotoxinas. Em adição, um surto de hepatite ocorrido na Índia em 1974 levou à morte de 100 pessoas, e sua causa foi atribuída ao consumo de milho contaminado por aflatoxinas (BENNETT; KLICH, 2003).

Citrinina

Citrinina (CIT) (**10**) (Figura 6) é uma quinona que foi isolada pela primeira vez em 1831 a partir de *Penicillium citrinum*. Desde então, ela tem sido repetidamente encontrada também em outras espécies do gênero *Penicillium*, e ainda em espécies de *Aspergillus* e *Monascus* (BARKAI-GOLAN, 2008a; MORETTI, 2017).

A sua fórmula estrutural permite a formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular, que promove uma cristalização em uma estrutura desordenada contendo as formas tautoméricas de para-quinona e ortoquinona, em um equilíbrio dinâmico no estado sólido (BOVDISOVA *et al.*, 2016) (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura química da citrinina (**10**)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Essa toxina fúngica é, comumente, produzida a partir da contaminação de grãos das plantas colhidas, sob condições típicas de armazenamento. Ela pode ser encontrada em culturas de milho, além de cereais, cebola, batata, cenoura e em rações animais. Outras fontes de CIT incluem feijão, frutas, sucos de frutas e vegetais, ervas e especiarias, produtos lácteos estragados e corante em alimentos asiáticos. Tal fato se deve à presença de espécies de *Penicillium* nessas culturas, dentre as quais podem ser destacadas *P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*, *P. lividum*, *P. fellutanum*, *P. implicatum*, *P. jensenii*, *P. canescens*, *P. purpurescens*, *P. roqueforti*, *P. thomii*, *P. verrucosum*. Entre

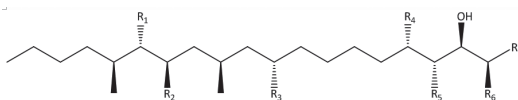
essas, *P. citrinum*, *P. viridicatum* e *P. expansum* destacam-se como patógenos em culturas de frutas e vegetais, que permanecem contaminando alimentos mesmo após o período de colheita (BARKAI-GOLAN, 2008a; MORETTI, 2017).

Historicamente, a citrinina (**10**) é uma das primeiras micotoxinas isoladas. Porém, embora ela seja umas das mais bem caracterizadas, o seu mecanismo de ação tóxica ainda é controverso, e muitos resultados foram obtidos em ensaios *in vitro*. Clinicamente ela é caracterizada como uma nefrotoxina, pois afeta significativamente as células renais (MORETTI, 2017), além de possuir efeito teratogênico pronunciado em aves domésticas, porcos, cachorros e ratos e de afetar o sistema imunológico (BARKAI-GOLAN, 2008a). Embora a CIT seja conhecida principalmente por suas propriedades tóxicas, há uma evidência crescente enfatizando algumas atividades biológicas positivas dessa micotoxina, especialmente anticancerígena e neuroprotetora, além de propriedades antibióticas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2017).

*Fumonisin*s

As fumonisinas são biossintetizadas, principalmente, por espécies do gênero *Fusarium*, no entanto também já foram relatadas para a espécie *Alternaria alternata*. O caminho biossintético das fumonisinas ainda está sendo investigado, sendo que alguns experimentos estabeleceram que esses compostos são originados pela condensação do aminoácido alanina com um intermediário policetídeo, que sofre esterificação com ácido tricarbóxico (TCA) acetato, para formar um grupo de pelo menos 28 substâncias denominadas A1- A3 (**11-13**), B1 (FB1- FB4) (**14-17**), AK1 (**18**), C1 (**19**), C3 (**20**), C4 (**21**), P1-P3 (**22-24**), PH1a (**25**) e PH1b (**26**) (Figura 7) (KSENIJA, 2018; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). As fumonisinas do tipo A são pouco relatadas devido à sua ocorrência em baixíssimas concentrações, enquanto as do tipo B perfazem o total de 80% das fumonisinas encontradas, as quais incluem FB1, FB2 e FB3 (**14**, **15** e **16**, respectivamente).

Figura 7 – Estruturas químicas das fumonisinas (11-26)



- FA1 (11) : R₁ = TCA R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = NHCOCH₃; R₇ = CH₃
 FA2 (12) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = H; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = NHCOCH₃; R₇ = CH₃
 FA3 (13) : R₁ = TCA R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = H; R₅ = H; R₆ = NHCOCH₃; R₇ = CH₃
 FB1 (14) : R₁ = TCA R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = CH₃
 FB2 (15) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = H; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = CH₃
 FB3 (16) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = H; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = CH₃
 FB4 (17) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = H; R₄ = H; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = CH₃
 FAK1 (18) : O; R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = NHCOCH₃; R₇ = CH₃
 FC1 (19) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = H
 FC3 (20) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = H; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = H
 FC4 (21) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = H; R₄ = H; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = H
 FP1 (22) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = 3PH; R₇ = CH₃
 FP2 (23) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = H; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = 3PH; R₇ = CH₃
 FP3 (24) : R₁ = TCA; R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = H; R₅ = H; R₆ = 3PH; R₇ = CH₃
 FPH 1a (25) : R₁ = TCA; R₂ = OH; R₃ = OH; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = CH₃
 FPH1b (26) : R₁ = OH; R₂ = TCA; R₃ = OH; R₄ = OH; R₅ = H; R₆ = NH₂; R₇ = CH₃

Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Em particular, *Fusarium verticillioides* é o maior produtor de fumonisinas, sendo a fumonisina B1 (14) a mais abundante na natureza e, também, juntamente com a fumonisina B2 (15), um deoxi análogo de 14, consideradas como os compostos mais tóxicos dessa classe (LINO; SILVA; PENA, 2006; NESIC; IVANOVIC; NESIC, 2014).

Em contraste com a maioria das micotoxinas que possuem natureza hidrofóbica, as fumonisinas são compostos hidrofílicos que possuem estrutura semelhante a esfingolípídios, também devido aos grupos TCAs, sendo responsáveis por doenças neurológicas, imunológicas e câncer. Estudos epidemiológicos humanos na África do Sul, Itália e China revelaram que o câncer de esôfago está relacionado à ingestão de grãos de milho contendo fumonisinas. Outra epidemia de defeitos do tubo neural (defeitos congênitos do cérebro, espinha dorsal ou medula espinhal), ocorrida ao longo da fronteira Texas-México, China e África do Sul, também foi associada ao consumo de milho contaminado por fumonisinas. Em animais, descobriu-se que as fumonisinas causam edema pulmonar e hidrotórax em suínos, leucoencefalomalacia em equino e HCC em ratos, além de câncer de esôfago, fígado, danos ao sistema nervoso, edema pulmonar em outros animais (LIEW; MOHD-REDZWAN, 2018; TAMURA *et al.*, 2015).

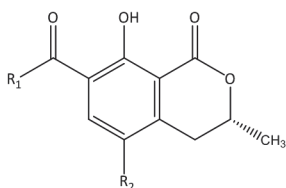
Ocratoxinas

As ocratoxinas constituem um grupo de micotoxinas contendo um anel isocumarina, sendo biossintetizadas comumente por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Esses compostos foram inicialmente descobertos na África do Sul, em 1965, a partir de *Aspergillus ochraceus* (que dá o nome à toxina) e, posteriormente, de *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. welwitschiae*. As espécies *Penicillium nordicum* e *P. verrucosum* são as principais fontes de ocratoxinas do gênero *Penicillium* (GIL-SERNA *et al.*, 2018).

As condições climáticas ideais para a produção desses compostos são muito variáveis, uma vez que espécies de *Aspergillus* podem produzi-los em climas quentes e úmidos, enquanto que espécies de *Penicillium* podem biossintetizá-los sob condições de baixas temperaturas (abaixo de 5 °C) (TOLA; KEBEDE, 2016).

A ocratoxina A (OTA) (27) (Figura 8) é a isocumarina clorada mais difundida e mais tóxica do grupo, no entanto existem outras ocratoxinas relacionadas à OTA, embora consideradas menos importantes. As mais relevantes são os seus análogos (ocratoxinas C e α) (29 e 30), os derivados desclorados (ocratoxinas B e β) (28 e 31), além dos ésteres metílicos das ocratoxinas A e B (32 e 33) e éster etílico da ocratoxina B (34) (Figura 8) (GIL-SERNA *et al.*, 2018).

Figura 8 – Estruturas químicas das ocratoxinas (27-34)



- OTA (27): R₁ = fenilalanina; R₂ = Cl
 OTB (28): R₁ = fenilalanina; R₂ = H
 OTC (29): R₁ = fenilalanina etil éster; R₂ = Cl
 OTalfa (30): R₁ = OH; R₂ = Cl
 OTbeta (31): R₁ = OH; R₂ = H
 OTA metil éster (32): R₁ = fenilalanina metil éster; R₂ = Cl
 OTB metil éster (33): R₁ = fenilalanina metil éster; R₂ = H
 OTB etil éster (34): R₁ = fenilalanina etil éster; R₂ = H

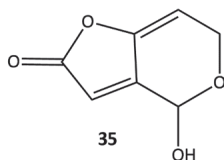
Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Esses compostos podem ser encontrados em culturas de uva, trigo, milho, arroz, cevada, centeio, café, ervilhas, entre outras, além de contaminarem produtos derivados de animais, como leite e carne (ALSHANNAQ; YU, 2017). A OTA (27) pode ser encontrada em regiões de cultivares de uvas e vinhos (PITT; TANIWAKI; COLE, 2013), além de ser muito estável em ambientes ácidos e de elevadas temperaturas, dificultando a sua eliminação dos alimentos, mesmo após o processo de cozimento (ALSHANNAQ; YU, 2017). Essa toxina apresenta propriedades nefrotóxica, teratogênica e imunotóxica em animais e humanos, tendo sido classificada como um possível carcinogênico humano pela *International Agency for Research on Cancer*. Desde a primeira ocorrência de OTA (27) em vinhos, vários estudos têm sido desenvolvidos para evitar a contaminação e prevenir a sua presença (GIL-SERNA *et al.*, 2018).

Patulina

A patulina (35) (Figura 9) é uma micotoxina caracterizada por um esqueleto da classe das hidroxifuropiranonas contendo um grupo hidróxi em C-4. Esse composto foi primeiramente isolado, em 1943, a partir de *Penicillium griseofulvum*, considerado o mais importante produtor de patulina em cultura de cereais. No entanto, essa micotoxina também já foi relatada em várias espécies de fungos, particularmente dos gêneros *Aspergillus*, *Byssochlamys* e *Penicillium* (VIDAL *et al.*, 2019). Outros exemplos de fungos produtores de patulina incluem *P. expansum* e *P. carneum* como as espécies mais promissoras na sua produção em pomares de maçãs (BARKAI-GOLAN, 2008a; MORETTI, 2017) e em cultivos de uvas, respectivamente, além de *P. sclerotigneum*, uma importante fonte de patulina em culturas de laboratório (FRISVAD *et al.*, 2006).

Figura 9 – Estrutura química da patulina (35)



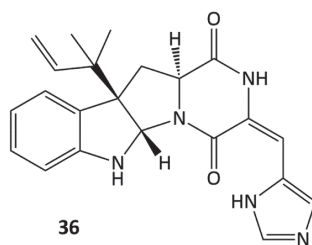
Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Acredita-se que a patulina (**35**) seja produzida como metabólito secundário para inibir o crescimento de outros micro-organismos. Em humanos, as avaliações de toxicidade demonstraram que exposição aguda à patulina pode causar sintomas gastrointestinais, incluindo náuseas, vômitos, úlceras, hemorragias intestinais e lesões no duodeno, efeitos adversos neurológicos e imunológicos. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), esse composto é um carcinogênico do grupo 3, o que significa que não há estudos baseados em pesquisas com animais ou estudos epidemiológicos suficientes para apoiar sua carcinogênese. Além disso, a OMS considera a patulina como um possível composto genotóxico (FRISVAD *et al.*, 2006; MORETTI, 2017).

Roquefortina C

Roquefortina C (**36**) (Figura 10) é um alcaloide indólico derivado da histidina e do triptofano, contendo um esqueleto tetracíclico com a combinação de unidades de anéis indólico, imidazólico e dicetopiperazina. Esse composto foi inicialmente isolado a partir de *Penicillium roqueforti* obtido de solo contaminado, embora já tenha sido encontrado em outras espécies de *Penicillium* (SHANGGUAN *et al.*, 2008).

Figura 10 – Estrutura química da roquefortina C (**36**)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

A roquefortina C (**36**) é produzida em queijos, silagem e carnes, por espécies de *P. roqueforti*, *P. carneum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. paneum*, *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. melanoconidium*, *P. radicum*, *P. sclerotigenum*, entre outras (MORETTI, 2017).

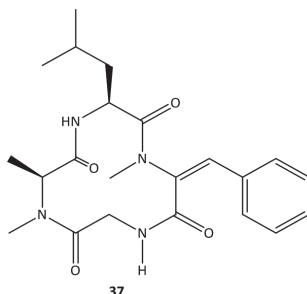
Esse composto demonstra atividade bacteriostática em bactérias Gram-positivas, porém os mecanismos de toxicidade para esse metabólito ainda não foram elucidados. Os relatos indicam um efeito neurotóxico, porém sua toxicidade aguda não é muito pronunciada, e, portanto, a sua classificação como micotoxina ainda é questionada por muitos autores (MORETTI, 2017). Um relato de que a injeção intraperitoneal de 50-100 mg por kg em camundongos machos causou convulsões é seguido por opiniões conflitantes, visto que esses testes foram realizados em roquefortina (**36**) isolada após uma variedade de procedimentos de isolamento. No entanto, a variabilidade das respostas observadas a diferentes testes de toxicidade indicou que os efeitos podem ser atribuídos a sinergismos de substâncias nos extratos de diferentes cepas (MORETTI, 2017).

Tentoxina (TEN)

A tentoxina (TEN) (**37**) (Figura 11) consiste num tetrapeptídeo cíclico que pode ser biossintetizado por várias espécies do gênero *Alternaria* (MORETTI, 2017), sendo comumente encontrada em grãos, cereais, hortaliças e sementes de oleaginosas (PAVÓN MORENO *et al.*, 2012).

A TEN (**37**) causa clorose nas plantas, ou seja, a produção de clorofila é significativamente alterada, tendo como sintoma aparente a mudança de cor das folhas que passam a apresentar um tom amarelado ou esbranquiçado devido à deficiência de clorofila. Essa micotoxina inibe a síntese de ATP nos cloroplastos, assim como a hidrólise do ATP, culminando na morte do vegetal (LOISEAU *et al.*, 2002; BARKAI-GOLAN, 2008a).

Figura 11– Estrutura química da tentoxina (TEN) (**37**)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Tricotecenos

Os tricotecenos são sesquiterpenoides, isolados pela primeira vez a partir do fungo *Trichothecium roseum* e, posteriormente, também relatados para os gêneros *Fusarium*, *Trichoderma* e *Myrothecium*. Esses compostos possuem em comum um núcleo tetracíclico chamado de tricotecano, contendo uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento epóxido nas posições 12 e 13, o que lhes confere grande reatividade e toxicidade. Eles podem se apresentar estruturalmente como compostos macrocíclicos ou conter cadeia simples, com variação na quantidade e posição de grupos hidroxilas e éster (TERCIOLO *et al.*, 2018).

Espécies do gênero *Fusarium*, geralmente, produzem tricotecenos constituídos de álcoois simples e ésteres de cadeia curta, enquanto que espécies de *Myrothecium* costumam produzir tricotecenos macrocíclicos de ésteres complexos (TERCIOLO *et al.*, 2018).

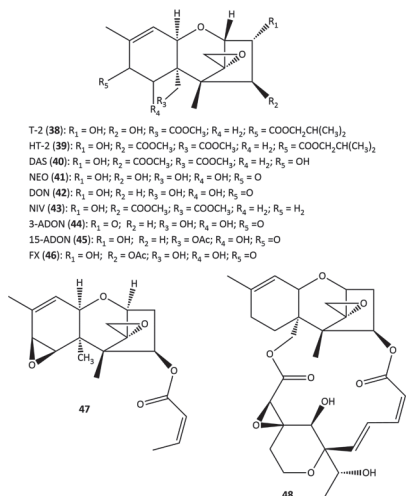
A biossíntese de tricotecenos acontece com a formação do sesquiterpeno tricodieno, seguida por oxigenação, esterificação e ciclização para fornecer a larga família de epóxidos de sesquiterpenos, que são divididos nos tipos A-D, de acordo com os grupos funcionais presentes em sua estrutura (Figura 12). Embora sejam relatados na literatura mais de 200 tipos de tricotecenos, somente poucos apresentam uma importância econômica. Os compostos do tipo A apresentam substituição no carbono 8 por um grupo hidróxi, éster ou nenhuma substituição e incluem o T-2 (38), HT-2 (39), diacetoxiscirpenol (DAS) (40) e neosolaniol (NEO) (41). Os tricotecenos do tipo B, nos quais o substituinte é um grupo carbonila, são representados pelo desoxinivalenol (DON (42), nivalenol (NIV) (43) e seus derivados, 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) (44), 15-acetideoxinivalenol (15-ADON) (45) e fusarenona X (FX) (46) (STANCIU *et al.*, 2015). Os tricotecenos do tipo C são caracterizados pela presença de um grupo epóxi nos carbonos C-7 e C-8 e incluem a crotocina (47), enquanto que os do tipo D são chamados de macrocíclicos por possuírem um anel adicional nos carbonos C-4 e C-15, sendo representados pela satratoxina G (48) (TERCIOLO, 2018) (Figura 12).

Os tricotecenos DON (42) e NIV (43) são os mais abundantes, enquanto o T-2 (38) e o DAS (40) são os mais tóxicos. No âmbito nacional e internacional, o tricoteceno de maior ocorrência é o DON (42).

Esses compostos são comumente encontrados como contaminantes de cultivos de cereais, incluindo trigo, milho e cevada. As condições climáticas favoráveis na Europa favorecem um aumento do nível de contaminação por essas micotoxinas. Além disso, esses compostos possuem uma relativa estabilidade durante os processos de moagem e tratamento dos grãos, sendo muito difícil eliminá-los dos produtos comercializados (TERCIOLO *et al.*, 2018).

De uma forma geral, os efeitos dos tricotecenos no organismo humano são diversos. Eles são capazes de inibir enzimas da síntese proteica, interferindo na divisão de células do trato gastrointestinal, pele, células linfoides, entre outras. Esses compostos também são imunossuppressores e podem causar hemorragia, além de vômitos, perda de apetite, diarreia e problemas na pele. Os tricotecenos do tipo A são rapidamente absorvidos pelas membranas gastrintestinais e distribuídos pelos órgãos e tecidos do corpo, sendo, portanto, considerados como os mais tóxicos tanto para humanos quanto para animais. Os sintomas de intoxicação são sangramento na boca e nariz, vômito, dor abdominal, diarreia e febre. Além disso, a exposição prolongada a essas toxinas fragiliza o sistema imunológico e pode causar inibição da síntese de proteínas (UNUSAN, 2019).

Figura 12 – Estruturas químicas dos tricotecenos (38-48)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Zearalenonas (ZEA)

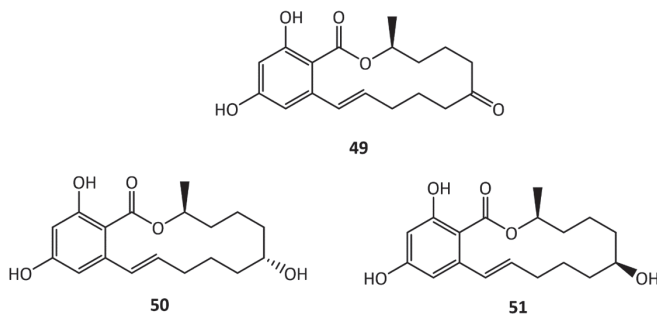
Zearalenona (ZEA) (**49**) (Figura 13) é uma micotoxina estrogênica não esteroidal e quimicamente descrita como a lactona do ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-*trans*-1-undecenil)- β -resorcíclico. Esse composto foi primeiramente isolado em 1962 pelo cultivo de *Fusarium graminearum*, porém a sua ocorrência natural só passou a ser investigada a partir de 1968 (KOWALSKA; HABROWSKA-GÓRCZY; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, 2016).

Atualmente, sabe-se que esse metabólito tóxico é biossintetizado, principalmente, por várias espécies do gênero *Fusarium*, sobretudo por *F. roseum*, *F. moniliforme*, *F. graminearum* e *F. culmorum* (BOEIRA, 2012; NEME; MOHAMMED, 2017; STROKA; GONÇALVES, 2017), particularmente em plantações de milho, arroz, cevada, aveia, milho, trigo, sorgo, em ambientes com temperaturas variando entre 12 e 14 °C e umidade relativa elevada, ou ainda em depósitos de estocagem. Em laboratório, a síntese de zearalenona se dá pelo cultivo de espécies de *Fusarium* por um período de três semanas em temperaturas entre 20 e 25 °C e umidade acima de 20% (BOEIRA, 2012).

A ZEA (**49**) é a micotoxina mais distribuída mundialmente e, embora não seja considerada um composto de elevada toxicidade, a biotransformação de ZEA (**49**) em animais envolve a formação de dois metabólitos majoritários, o α -zearalenol (α -ZOL) (**50**) e o β -zearalenol (β -ZOL) (**51**). Devido às semelhanças estruturais com o estrogênio endógeno 17 β -estradiol, a ZEA (**49**) é considerada uma das mais importantes micotoxinas que causam anormalidades no sistema reprodutor, sobretudo de suínos, além de causar abortos, redução na produção de ovos em frangos e alteração do ciclo menstrual em mamíferos. O α -ZOL (**50**) possui maior estrogenicidade que a ZEA (**49**), mas o β -ZOL (**51**) é menos estrogênico. Esses compostos atuam de forma semelhante ao 17 β -estradiol, inibindo a secreção e liberação de hormônios esteroides, interrompendo a resposta estrogênica endógena durante o estágio pré-ovulatório e deprimindo a maturação dos folículos ovarianos (KOWALSKA; HABROWSKA-GÓRCZY; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, 2016). Essa atividade estrogênica provoca vários distúrbios reprodutivos em animais

domésticos, bem como síndromes hiperestrogênicas em humanos, as quais dependem da dose e do tempo de exposição. Alguns estudos ainda estão sendo realizados para verificar a relação entre a exposição à ZEA (49) e doenças intestinais crônicas que podem acometer humanos (BERTERO; SPICER; CALONI, 2018).

Figura 13 – Estruturas químicas da ZEA (49) e de seus metabólitos derivados α -ZEA (50) e β -ZEA (51)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Métodos de análise de micotoxinas

O crescente interesse na prevenção e detecção de micotoxinas resultou em várias metodologias para sua detecção, bem como na utilização de equipamentos robustos e altamente seletivos para as análises dos mais variados tipos de extrato (MALACHOVÁ *et al.*, 2017).

As micotoxinas podem estar presentes em diversas matrizes, uma vez que os micro-organismos podem colonizar os mais variados ambientes. Assim, a identificação desses metabólitos pode exigir métodos de preparo, concentração e análise de amostras bastante distintos. Na literatura, são relatadas metodologias diversificadas para análise de micotoxinas presentes em frutas (WANG *et al.*, 2015), milho, amendoim, farinha de trigo (STECHEER *et al.*, 2007; ZHANG, K. *et al.*, 2016), cereais (LI *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2011), vinhos, cerveja (SÁEZ *et al.*, 2004), café (SIBANDA; SAEGER; PETEGHEM, 2002), arroz (JUAN *et al.*, 2005), biscoitos (MEDINA *et al.*, 2019) e até mesmo em fluidos biológicos, como urina (BÖHM; JARUKAMJORN; ZENTEK, 2003).

O processo de extração de micotoxinas, bem como a escolha do solvente a ser utilizado, está condicionado ao tipo de matriz e/ou tipo de micotoxina presente. Essas condições podem levar a um processo em várias etapas. De uma forma geral, dependendo da amostra, ela pode ser moída objetivando-se o aumento na superfície de contato e o aumento da eficiência na extração dos analitos. Não existe um solvente específico para extração de cada micotoxina, o solvente escolhido poderá extrair vários grupos desses metabólitos, sendo necessária, posteriormente, a purificação do extrato obtido (SHANAKHAT *et al.*, 2018).

A maioria das micotoxinas é solúvel em solventes polares, sendo comumente utilizados nos processos de extração o metanol, a acetona, a acetonitrila, o acetato de etila, o éter dietílico, o tolueno e o clorofórmio. Muitas vezes, uma mistura de dois ou mais desses solventes é empregada. Água também é utilizada para a extração de algumas micotoxinas, por exemplo, a DON (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009).

Após o processo de extração com uso de solventes orgânicos, outras moléculas que não são de interesse também podem ser extraídas. Dessa forma, a amostra deve passar por um procedimento chamado de *cleanup* (pré-purificação) antes de seguir para análise instrumental, utilizando métodos de extração em fase sólida – EFS, partição líquido-líquido, cromatografia em coluna, colunas de imunoafinidade etc. A remoção de lipídios da amostra, por exemplo, pode ser feita após o processo de extração e filtragem com o uso de solventes apolares, como o hexano (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009; SHANAKHAT *et al.*, 2018).

Várias estratégias de análise vêm sendo desenvolvidas para a determinação de micotoxinas, particularmente aquelas envolvendo o uso da cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas (CL-EM).

Entre essas, a espectrometria de massas em *tandem* acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EM/EM) é bastante utilizada para análises de diferentes matrizes de micotoxinas devido à incrível capacidade de separação e identificação simultânea de vários compostos presentes em uma matriz complexa (MOHAMED; ALSHARIF; CHOO, 2019; ZHANG, K. *et al.*, 2016; ZHANG, Z. *et al.*, 2016). O modo de

ionização mais empregado é o de ionização por *electrospray*, em virtude da sua compatibilidade com os mais diversos sistemas de separação cromatográfica (MOHAMED; ALSHARIF; CHOO, 2019).

Alguns analisadores de espectrômetros de massa se destacam nas análises, como triplo quadrupolo, armadilha de íons (*ion trap*), analisador por tempo de voo (*time of light* – ToF), além de sistemas que combinam dois analisadores, como no caso do quadrupolo-tempo de voo (*quadrupole-time of flight* – QToF), quadrupolo-*orbitrap* e sistemas lineares *ion trap-orbital ion trap* (MALACHOVÁ *et al.*, 2017).

Métodos objetivando a otimização do uso de diferentes colunas, bem como de tempo de análises de diversas micotoxinas, também são relatados para extratos de diferentes gêneros alimentícios, como frutos secos, óleo de gergelim, ração animal, queijo, milho, avelã, pistache, cacau, café, páprica e pão. Esses estudos de otimização da identificação de micotoxinas em alimentos usando a técnica de LC-MS são muito importantes para os laboratórios da indústria alimentícia que realizam análises rotineiras de grandes quantidades de amostras (ŞENYUVA *et al.*, 2008).

Estratégias para a identificação de metabólitos em um extrato bruto envolvem a desrepliação, que é feita através de análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Essa técnica permite a rápida identificação de compostos conhecidos presentes em uma mistura a partir do cruzamento de dados obtidos de LC-MS com bancos de dados apropriados a partir das informações de fragmentação dos íons (NIELSEN *et al.*, 2011). Para compostos microbianos, o banco de dados mais abrangente é o AntiBase (Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha) (TÖLGYESI; KUNSÁGI, 2013).

A partir de vários estudos detalhados na literatura, a análise do padrão de fragmentação de algumas classes de micotoxinas tem sido relatada. Por exemplo, a identificação de vários tipos de CPA revelou um padrão de fragmentação para o α -CPA protonado $[M+H]^+$, com um íon precursor em m/z 337,1536. A partir desse íon, foram observados fragmentos em m/z 196, 182, 167, 154 e 140. O íon em m/z 196 se refere à espécie $C_{14}H_{14}N^+$, enquanto os demais são oriundos da clivagem da ligação entre os carbonos C-4 e C-5 e C-9 e C-10 do anel D da porção de ácido tetrâmico da molécula, da eliminação de um fragmento metil

(- CH₃) a partir do íon em m/z 182; e o íon em m/z 140 é originário do anel E do CPA, respectivamente. A eliminação de uma molécula de água a partir do íon precursor justifica a presença de um íon em m/z 319 (UKA *et al.*, 2017). O composto β -CPA é precursor do α -CPA sendo que sua estrutura apresenta abertura nos anéis C e D. O íon precursor analisado no modo positivo ($[M+H]^+$, m/z 339.1700) apresenta fragmentos em m/z 283, correspondendo à perda do grupo (CH₃)C=CH₂-. O pico m/z 198 (C₁₄H₁₆N⁺) também pode ser verificado devido à clivagem da ligação entre os carbonos 4 e 5. Íons em m/z 156 (C₁₁H₁₀N⁺), 155 (C₁₁H₉N⁺) e 154 (C₁₁H₈N⁺) podem ser explicados pela ciclização que ocorre em fragmentos iniciais a partir do íon precursor, com formação de uma ligação entre os carbonos C4 e C11, com fechamento do anel C apresentando m/z 198. O íon em m/z 144 (C₁₀H₁₀N⁺) é formado a partir do íon de massa 198 pela perda da porção isoprenoide (UKA *et al.*, 2017).

Por outro lado, o perfil de fragmentação observado para a micotoxina aflatoxina B1 por LC-MS/MS no modo positivo exibiu íons em m/z 313 para o precursor $[M+H]^+$, além de íons característicos em m/z 285, 257, 229 e 201 devido a perdas sucessivas de CO (IRAM *et al.*, 2015). A análise da ocratoxina A (OTA) no modo positivo e com fonte de ionização por *electrospray* revelou a presença do íon precursor m/z 403, além do fragmento m/z 239 ($[M+H\text{-fenilalanina}]^+$). Esse íon produto obtido após a perda do fragmento fenilalanina é o mais característico para a detecção de OTA (EDIAGE *et al.*, 2015).

A determinação de tricotecenos do tipo A por HRMS (espectrometria de massas em alta resolução) é baseada nos íons m/z 245.1172, 215.1067 e 197.0961, como íons característicos para esse grupo de toxinas (GONZÁLEZ-JARTÍN *et al.*, 2018). A eliminação do grupo isovalerioxi e ácido acético é caminho comum para as toxinas T-2 e HT-2, enquanto a clivagem do grupo epóxi foi o caminho de fragmentação comum para o DON, 3AcDON e NIV (LIU *et al.*, 2012).

Apesar da eficiente contribuição da espectrometria de massas na identificação de micotoxinas, a ressonância magnética nuclear também é utilizada como uma ferramenta auxiliar para a sua elucidação estrutural, principalmente pelo uso de técnicas hífenadas de RMN com a cromatografia líquida. Esta técnica é ainda mais explorada quando a

estereoquímica de alguns produtos isoméricos precisa ser elucidada. No caso particular dos tricotecenos, mais de 90% dos compostos já relatados tiveram sua estrutura e estereoquímica definidas por essa técnica (SHANK *et al.*, 2011).

O uso da RMN associada a ferramentas quimiométricas para auxiliar na identificação de metabólitos tóxicos biossintetizados por fungos também está em constante crescimento nos últimos anos. Ao se trabalhar com metabólitos oriundos do cultivo de dois ou mais micro-organismos, muitas vezes, faz-se necessário o emprego de ferramentas que possibilitem a separação dos metabólitos em grupos que sejam característicos de cada gênero ou espécie trabalhados. Assim, a cromatografia acoplada à técnica de RMN permite a separação e identificação dos metabólitos, ao passo que as ferramentas de análises quimiométricas se encarregam de fornecer informações concernentes aos grupos de metabólitos biossintetizados e de identificar quais são associados a determinadas espécies investigadas (SELEGATO *et al.*, 2016).

Conclusão

A contaminação de alimentos por fungos produtores de micotoxinas é uma preocupação mundial que não pode ser ignorada. A presença desses metabólitos tóxicos prejudica não somente o desenvolvimento das plantações e a conservação dos alimentos, mas principalmente os humanos e animais que as ingerem, causando efeitos devastadores do ponto de vista econômico e de saúde pública.

A eliminação desses compostos de uma forma efetiva ainda não é possível, e, por essa razão, a identificação precoce acerca da diversidade e incidência de fungos micotoxigênicos durante a sua proliferação nas lavouras, assim como no processo de armazenamento pós-colheita, é um desafio a ser superado.

Apesar do avanço das pesquisas na identificação e análise dessas substâncias tóxicas, ainda não foi encontrado um método totalmente satisfatório de prevenção. Algumas práticas que estão sendo atualmente adotadas na prevenção das micotoxicoses incluem a aplicação de procedimentos de desintoxicação após a colheita, pela incorporação

de desativadores de micotoxinas em rações de animais, ou ainda a obtenção de sementes geneticamente modificadas resistentes aos ataques de fungos. No entanto, apesar desses grandes esforços e precauções, sempre existirá uma probabilidade real de contaminação.

Dessa forma, os níveis de contaminação por micotoxinas nos alimentos devem ser rigidamente controlados por meio de leis e dos órgãos de fiscalização. Atualmente, as instituições internacionais do *Codex Alimentarius* e o Comitê da FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares e Contaminantes (JECFA) desenvolvem estratégias e ações a fim de minimizar a ocorrência de micotoxinas e os efeitos danosos à saúde animal e humana. No Brasil, a Resolução RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2010, dispõe sobre limites máximos de micotoxinas em alimentos, incluindo limites para aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona, em alimentos prontos para a oferta ao consumidor e em matérias-primas (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

Referências

- AL-JAAL, B. A. *et al.* Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: a systematic literature review 2001-2018. *Food and Chemical Toxicology*, v. 129, p. 211-228, 2019.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 14, p. 632-652, 2017.
- ASHIQ, S.; HUSSAIN, M.; AHMAD, B. Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: a review. *Fungal Genetics and Biology*, v. 66, p. 1-10, 2014.
- BARKAI-GOLAN, R. *Alternaria* mycotoxins. In: BARKAI-GOLAN; NACHMAN, P. (ed.). *Mycotoxins in fruits and vegetables*. San Diego: Academic Press, 2008b. p. 185-203.

BARKAI-GOLAN, R. *Penicillium* mycotoxins. In: BARKAI-GOLAN; NACHMAN, P. (ed.). *Mycotoxins in fruits and vegetables*. San Diego: Academic Press, 2008a. p. 153-183.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BERTERO, A.; SPICER, L. J.; CALONI, F. *Fusarium* mycotoxins and *in vitro* species-specific approach with porcine intestinal and brain *in vitro* barriers: a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 121, p. 666-675, 2018.

BERTHILLER, F. *et al.* Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, v. 119, p. 33-37, 2007.

BOEIRA, S. P. *Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul, 2012.

BÖHM, J.; JARUKAMJORN, K.; ZENTEK, J. Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 796, p. 21-33, 2003.

BOVDISOVA, I. *et al.* Toxicological properties of mycotoxin citrinin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 1, p. 10-13, 2016.

CABRAL, L. C. *et al.* Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from mouldy peppers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 236, p. 155-160, 2016.

CHEN, S.; QIANG, S. Recent advances in tenuazonic acid as a potential herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 143, p. 252-257, 2017.

EDIAGE, E. N.; POUCKE, C. V.; SAEGER, S. de. A multi-analyte LC – MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sor-

ghum varieties: the forgotten sample matrix. *Food Chemistry*, v. 177, p. 397-404, 2015.

FRAEYMAN, S. *et al.* Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: occurrence, toxicity and toxicokinetics. *Toxins*, v. 9, n. 7, p. 1-26, 2017.

FREIRE, L.; SANT'ANA, A. S. Modified mycotoxins: an updated review on their formation, detection, occurrence and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, v. 111, p. 189-205, 2018.

FRISVAD, J. C. *et al.* Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 571, p. 3-31, 2006.

GIL-SERNA, J. *et al.* Wine contamination with ochratoxins: a review. *Beverages*, v. 4, p. 2-21, 2018.

GONZÁLEZ-JARTÍN, J. M. *et al.* Detection of new emerging type-A trichothecenes by untargeted mass spectrometry. *Talanta*, v. 178, p. 37-42, 2018.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 7, p. 138-161, 2010.

IRAM, W. *et al.* Mass spectrometric identification and toxicity assessment of degraded products of aflatoxin B1 and B2 by *Corymbia citriodora* aqueous extracts. *Nature Publishing Group*, v. 1, p. 1-15, 2015.

ISMAIEL, A.; PAPENBROCK, J. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*, v. 5, n. 3, p. 492-537, 2015.

JUAN, C. *et al.* Accelerated solvent extraction of ochratoxin A from rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 9348-9351, 2005.

KOWALSKA, K.; HABROWSKA-GÓRCZY, D. E.; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, A. W. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans.

Environmental Toxicology and Pharmacology Journal, v. 48, p. 141-149, 2016.

KSENIJA, N. Mycotoxins-climate impact and steps to prevention based on prediction. *Acta Veterinaria*, v. 68, n. 1, p. 1-15, 2018.

KUMAR, P. *et al.* Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-10, 2017.

LI, C. *et al.* Determination of aflatoxins in rice and maize by ultra-high performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and solid-phase extraction. *Analytical Letters*, v. 47, n. 9, p. 1485-1499, 2014.

LIEW, W.-P.-P.; MOHD-REDZWAN, S. Mycotoxin: its impact on gut health and microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, p. 60-77, 2018.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 293-299, 2006.

LIU, Z-Y. *et al.* Fragmentation study of five trichothecenes using electrospray hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry with accurate mass measurements. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 309, p. 133-140, 2012.

LOISEAU, N. *et al.* High yield synthesis of tentoxin, a cyclic tetrapeptide. *Journal of Peptide Science*, v. 8, p. 335-346, 2002.

MAGAN, N. *Mycotoxins in Food*. [S. l.]: Woodhead Publishing, 2004.

MALACHOVÁ, A. *et al.* Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, p. 18-30, 2017.

MEDINA, B. G. *et al.* Validation and application of an analytical method for the determination of mycotoxins in crackers by UPLC-MS/MS. *Food Science and Technology*, v. 2061, p. 1-9, 2019.

MELO, M. P. D. E. *Espécies biológicas e filogenéticas do complexo Fusarium fujikuroi*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

MOHAMED, A.; ALSHARIF, A.; CHOO, Y. Detection of five mycotoxins in different food liquid chromatography electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Toxins*, v. 11, p. 2-15, 2019.

MORETTI, A. *Mycotoxigenic Fungi*. [S. l.]: Springer Protocols, 2017.

NEME, K.; MOHAMMED, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies: a review. *Food Control*, v. 78, p. 412-425, 2017.

NESIC, K.; IVANOVIC, S.; NESIC, V. Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 228, p. 101-120, 2014.

NGUYEN, T. T. T. *et al.* Mycotoxin production of *Alternaria* strains isolated from Korean barley grains determined by LC-MS/MS. *International Journal of Food Microbiology*, v. 268, p. 44-52, 2018.

NIELSEN, K. F. *et al.* Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 2338-2348, 2011.

OLIVEIRA FILHO, J. W. G. de O. *et al.* A comprehensive review on biological properties of citrinin. *Food and Chemical Toxicology*, v. 110, p. 130-141, 2017.

OSTRY, V. *et al.* Cyclopiazonic acid: 50th anniversary of its discovery. *World Mycotoxin Journal*, v. 11, p. 135-148, 2018.

OTTONI, J. R. *Análise da incidência de Fusarium spp. toxigênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PAVÓN MORENO, M. Á. *et al.* Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutricion Hospitalaria*, v. 27, p. 1772-1781, 2012.

PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H.; COLE, M. B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. *Food Control*, v. 32, p. 205-215, 2013.

PRENDES, L. P. *et al.* Natural occurrence and production of tenuazonic acid in wine grapes in Argentina. *Food Science & Nutrition*, v. 6, p. 523-531, 2018.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 8, p. 202-251, 2009.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2101-2105, 2002.

SÁEZ, J. M. *et al.* Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1029, p. 125-133, 2004.

SELEGATO, D. M. *et al.* New dereplication method applied to NMR-based metabolomics on different *Fusarium* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, p. 1421-1431, 2016.

ŞENYUVA, H. *et al.* Rapid LC and LC/MS for routine analysis of mycotoxins in foods. *World Mycotoxin Journal*, v. 1, p. 229-235, 2008.

SHANAKHAT, H. *et al.* Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 98, p. 4003-4013, 2018.

SHANGGUAN, N. *et al.* The total synthesis of roquefortine C and a rationale for the thermodynamic stability of isoroquefortine C over roquefortine C. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, p. 6281-6287, 2008.

SHANK, R. A. *et al.* Current and future experimental strategies for structural analysis of trichothecene mycotoxins-A prospectus. *Toxins*, v. 3, p. 1518-1553, 2011.

SIBANDA, L.; DE SAEGER, S.; VAN PETEGHEM, C. Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. *Journal of Chromatography A*, v. 959, p. 327-330, 2002.

SIEGEL, D. *et al.* Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 9622-9630, 2010.

SOLHAUG, A. *et al.* The mycotoxin alternariol induces DNA damage and modify macrophage phenotype and inflammatory responses. *Toxicology Letters*, v. 239, n. 1, p. 9-21, 2015.

STANCIU, O. *et al.* Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat from Europe: a review. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, v. 19, p. 35-60, 2015.

STECHER, G. *et al.* Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. *Talanta*, v. 73, p. 251-257, 2007.

STROKA, J.; GONÇALVES, C. Mycotoxins in food and feed: an overview. *Journal of Food Quality*, v. 2017, p. 1-19, 2017.

TAMURA, M. *et al.* Identification and quantification of fumonisin A1, A2, and A3 in corn by high-resolution liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry. *Toxins*, v. 7, p. 582-592, 2015.

TAYLOR, P. *et al.* Quantitative analysis of mycotoxins in cereal foods by collision cell fragmentation-high-resolution mass spectrometry: performance and comparison with triple-stage quadrupole detection. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 28, p. 1424-1437, 2011.

TERCIOLO, C. *et al.* Review article: role of satiety hormones in anorexia induction by trichothecene mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*, v. 121, p. 701-714, 2018.

TOLA, M.; KEBEDE, B. Occurrence, importance and control of mycotoxins: a review. *Cogent Food & Agriculture*, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2016.

TÖLGYESI, Á.; KUNSÁGI, Z. Quantification of T-2 and HT-2 mycotoxins in cereals by liquid chromatography-multimode ionization-Tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 106, p. 300-306, 2013.

UKA, V. *et al.* Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC triple-TOF HRMS. *Toxins*, v. 9, p. 1-21, 2017.

UNUSAN, N. Systematic review of mycotoxins in food and feeds in Turkey. *Food Control*, v. 97, p. 1-14, 2019.

VIDAL, A. *et al.* The mycotoxin patulin: an updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, v. 129, p. 249-256, 2019.

WANG, M. *et al.* A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1429, p. 22-29, 2015.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 15, p. 129-144, 2011.

ZHANG, K. *et al.* A collaborative study: determination of mycotoxins in corn, peanut butter and wheat flour using stable isotope dilution assay (SIDA) and liquid chromatography-Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 7138-7152, 2016.

ZHANG, Z. *et al.* Determination for multiple mycotoxins in agricultural products using HPLC-MS/MS via a multiple antibody immunoaffinity column. *Journal of Chromatography B*, v. 1021, p. 145-152, 2016.

ESTUDO BIOGUIADO DE MICRO-ORGANISMOS: uma estratégia para descoberta de compostos bioativos

*João Evangelista de Ávila, Fátima Miranda Nunes
e Mary Anne Sousa Lima*

Introdução

Os compostos bioativos de produtos naturais são originados de amostras de alta complexidade molecular, sendo necessária a realização de inúmeras etapas experimentais para a obtenção do composto puro. Apesar disso, o desenvolvimento dessas etapas tem se tornado cada vez mais rápido devido aos constantes avanços tecnológicos das ferramentas analíticas envolvidas nos processos de separação e identificação de moléculas orgânicas. Diversos estudos que combinam os processos de purificação de moléculas e bioensaios preliminares de extratos e frações vêm sendo desenvolvidos com sucesso, tornando-se uma estratégia eficiente na obtenção de compostos bioativos (HE *et al.*, 2018; SAKINAH *et al.*, 2018). Essa estratégia recebe a designação de **estudo bioguiado** ou **fracionamento bioguiado**. As frações obtidas durante o fracionamento cromatográfico são submetidas a bioensaios, e somente aquelas ativas são preferencialmente submetidas às etapas de purificação seguintes (MALVIYA; MALVIYA, 2017).

Diversos termos são usados na literatura internacional para designar os estudos bioguiados. Os principais são *bioassay-guided fractionation*,

activity-guided fractionation, *bioassay-directed fractionation*, *bioactivity-guided fractionation*, *activity-directed fractionation*, *bio(-)guided fractionation*, entre outros (WELLER, 2012). No entanto, é possível encontrar trabalhos que não apresentam nenhuma dessas nomenclaturas, mas que têm os fracionamentos cromatográficos direcionados pelos resultados do ensaio de atividade biológica das amostras a serem purificadas.

Mesmo dispondo de pequenas quantidades de amostra, os ensaios biológicos *in vitro* (ensaio específico ou múltiplos ensaios) podem ser realizados (PIETERS; VLIETINCK, 2005) se associados às técnicas de triagem biológica automatizadas em grande escala (do inglês *high throughput screening* – HTS). Esses ensaios permitem a construção de bibliotecas de compostos bioativos sem a necessidade do isolamento das moléculas (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Tais informações, além de direcionarem a purificação de moléculas bioativas, permitem realizar o mapeamento da natureza química dos compostos produzidos por uma determinada espécie.

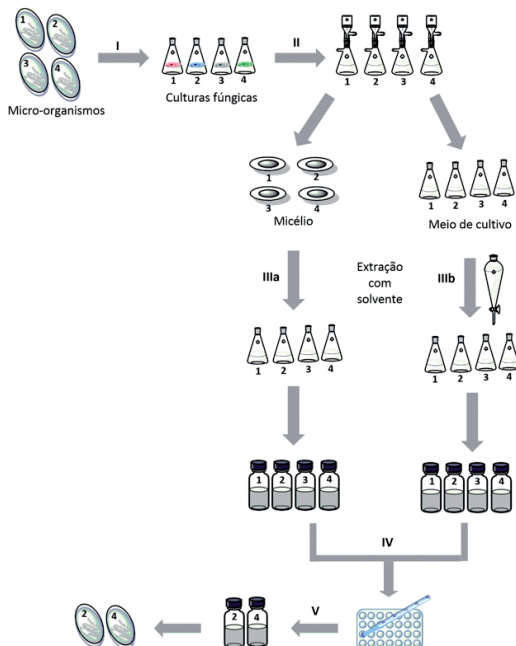
Uma série de trabalhos de isolamento de produtos naturais de micro-organismos, principalmente fungos e bactérias, vem sendo realizada por meio de fracionamentos bioguiados, levando à obtenção de compostos com as mais variadas atividades, como antitumoral, antibiótica, antifúngica e antiviral (SHUKLA, 2015). A diversidade desses compostos é um fator determinante nas variadas ações biológicas reportadas. Dentro desse contexto, destaca-se o fungo *Aspergillus niger*, que é reportado na literatura como um dos mais versáteis no tipo de metabólito secundário produzido, variando desde os mais simples aos de alta complexidade estrutural (LIMA *et al.*, 2019). Nesses casos, o fracionamento bioguiado, de extratos e frações, pode racionalizar as etapas de separação de determinadas classes de compostos, uma vez que o tipo de metodologia de separação pode ser muito específico.

As condições de cultivo ideal do micro-organismo, para a produção de compostos bioativos, também podem ser determinadas por resultados de ensaios de atividade dos extratos, o que mostra que os estudos bioguiados não estão restritos às etapas de fracionamento. A avaliação da composição do meio e das condições de cultivo é importante, pois esses fatores podem influenciar na expressão ou quantidade de uma determinada molécula bioativa produzida pelo micro-organismo (ANTONIO *et al.*, 2012; KUMARI *et al.*, 2018).

Etapas do estudo bioguiado

A seleção de um micro-organismo por estudo bioguiado pode ser resumida em cinco etapas, representadas na Figura 1. A primeira etapa (**I**) envolve o cultivo dos micro-organismos em meios de cultura selecionados e/ou específicos, normalmente em pequena escala, durante um certo período, em condições apropriadas. Após o cultivo na etapa seguinte (**II**), o micélio é separado do meio de cultura por filtração, e o filtrado (meio de cultura) é extraído por partição líquido-líquido e, após concentrado, fornece o extrato bruto (**IIa**) do meio de cultura. O micélio também pode ser submetido à extração com solvente orgânico (**IIIb**). Os extratos orgânicos são submetidos ao primeiro ensaio biológico (**IV**), que determinará o meio de cultivo apropriado e que será selecionado para estudo em grande escala (**V**).

Figura 1 – Esquema representativo de estudo bioguiado de micro-organismo

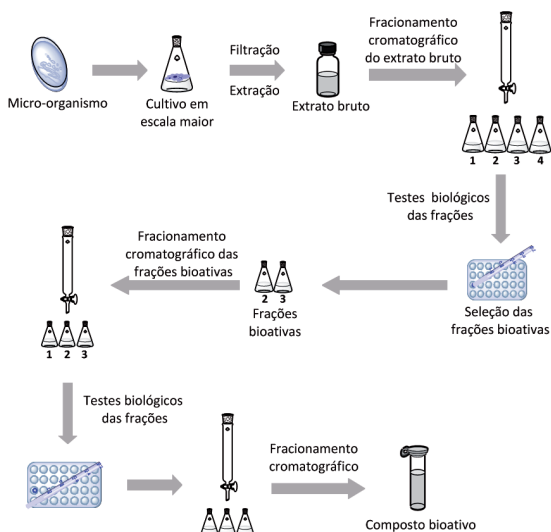


Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Uma vez selecionado(s) o(s) micro-organismo(s) a ser(em) estudado(s), este(s) é(são) submetido(s) a um cultivo em escala maior, do qual será(ão) extraído(s) com solventes orgânicos, obtendo-se extratos brutos. Como já citado anteriormente, os extratos de interesse serão fracionados usando-se métodos cromatográficos (Figura 2). Nos fracionamentos cromatográficos, serão usados solventes orgânicos puros ou em misturas binárias, que resultarão na obtenção de frações ricas em compostos com polaridades específicas de acordo com os solventes de eluição. Uma das técnicas cromatográficas de separação mais usadas é a purificação em coluna de vidro aberta (Figura 3), além de partições líquido-líquido, fracionamento em cartuchos de sílica de fase reversa e equipamentos de separação mais robustos, como cromatógrafos líquidos de alta eficiência (MANSSON *et al.*, 2010).

As frações obtidas são novamente submetidas a ensaio de atividade biológica, e as que apresentam resultados positivos são submetidas a novos procedimentos cromatográficos de purificação. Bioensaios para avaliar a atividade são feitos a cada fracionamento cromatográfico realizado, até a obtenção da(s) substância(s) pura(s) biologicamente ativa(s).

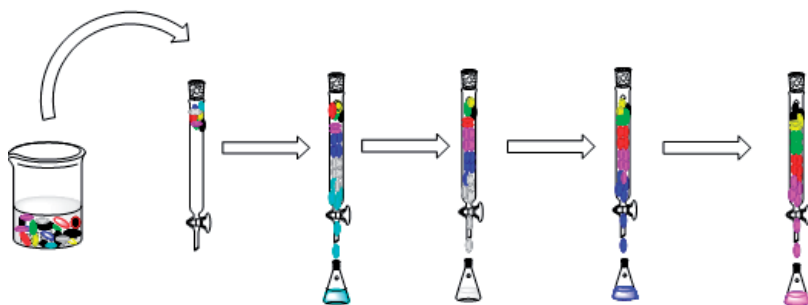
Figura 2 – Esquema representativo do fracionamento bio guiado de extratos bioativos



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Após a purificação dos compostos ativos, é necessário realizar a caracterização dessas moléculas. As técnicas espectrométricas de identificação de compostos orgânicos, como ressonância magnética nuclear uni- e bidimensional de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massas, infravermelho e ultravioleta, são as mais usadas. O grau de caracterização dependerá da natureza da molécula. Se forem inéditas, é necessária a realização de outras análises, como determinação do ponto de fusão (no caso de sólidos) e determinação da atividade ótica para compostos opticamente ativos.

Figura 3 – Esquema representativo do pré-fractionamento de um extrato bruto em coluna cromatográfica aberta



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

A complexidade de um extrato bruto e as interações entre as moléculas podem, de certa forma, mascarar a atividade de um composto que esteja em menor quantidade no meio, sendo necessário o pré-fractionamento do extrato como o primeiro passo da investigação. Estudo realizado por Appleton, Buss e Butler (2007) sobre pré-fractionamento de extratos para *screening* de bioatividade mostrou que 80% dos extratos testados não apresentavam atividade quando ensaiados na forma bruta. No entanto, algumas das frações pré-purificadas desses extratos brutos apresentaram resultados positivos no teste de atividade biológica. Essa porcentagem é bem menor quando comparada ao número de extratos que perderam atividade após o fractionamento, que foi de 13%. Um fato interessante que comprova a eficácia do pré-fractionamento dos extratos brutos é que 63% dos compostos isolados com bioatividade

tiveram sua origem de extratos brutos que não apresentaram atividade na triagem inicial. Isso mostra que, apesar da importância de se fazer a triagem de extratos brutos para teste de atividades, é indispensável fracionar amostras brutas que não apresentaram resultados positivos no primeiro ensaio. Caso contrário, uma quantidade considerável de compostos bioativos pode passar despercebida.

Sabendo-se que um extrato bruto é formado por um conjunto complexo de moléculas (gorduras, clorofila, sais e compostos ativos e não ativos biologicamente) de diferentes classes, polaridade, afinidade e funções biológicas que interagem no mesmo ambiente, sempre existe o risco de ocorrer um falso positivo. Como exemplo, têm-se os lipídeos e alguns tipos de gorduras, que são moléculas que não têm propriedades biológicas, mas que interagem e quebram a parede celular das células tumorais. Essas interações podem mascarar o teste de atividade na triagem inicial e confundir a interpretação dos resultados (SHOICHET, 2006).

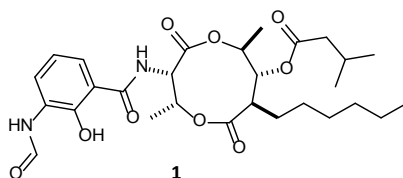
Outro fator importante que deve ser levado em consideração no fracionamento bioguiado de extratos de micro-organismos é o meio de cultura, uma vez que os componentes do meio de cultura podem interferir no resultado do teste de atividade. Na composição de alguns meios de culturas, estão presentes sais, aminoácidos e gorduras que podem colaborar para o falso positivo. Dessa forma, extratos e frações do meio de cultura empregado no cultivo do micro-organismo devem ser utilizados como “amostras branco” nos bioensaios para remover a sua influência no resultado.

Estudos baseados em fracionamentos bioguiados de micro-organismos

Um dos primeiros estudos de fracionamento bioguiado de extrato de micro-organismos foi publicado por Schneider, Tener e Strong (1952). Nesse trabalho, foi desenvolvida uma metodologia de isolamento e purificação do antibiótico antimicina A (1) (Figura 4), proveniente do cultivo de *Streptomyces* sp. O extrato obtido da fermentação do micro-organismo foi fracionado com diferentes solventes orgânicos.

As frações foram testadas quanto à ação antibiótica, e a fração bioativa levou ao isolamento de **1**. Embora abordagens similares tivessem sido aplicadas anteriormente, esse foi o estudo que direcionou diversas outras pesquisas na área de produtos naturais com potenciais aplicações biotecnológicas (WELLER, 2012).

Figura 4 – Estrutura química do antibiótico antimicina A



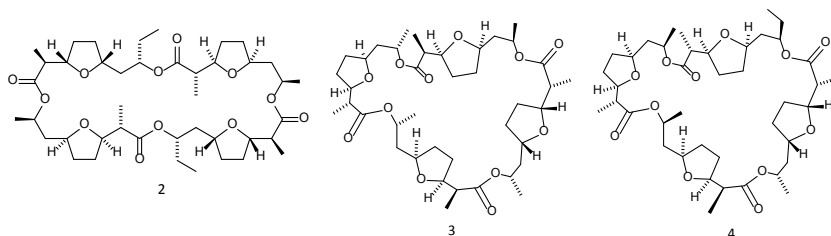
Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

É possível encontrar inúmeros trabalhos na literatura relacionados à obtenção de compostos bioativos isolados de bactérias (SCHINKE *et al.*, 2017), apresentando uma enorme variedade das classes de compostos de produtos naturais. Hussain *et al.* (2018) publicaram um estudo de metabólitos isolados de *Streptomyces puniceus*, uma actinobactéria proveniente do solo, que apresentaram ação antimicrobiana e antitumoral com baixa citotoxicidade para células normais. A ação antimicrobiana foi testada contra o *Mycobacterium tuberculosis*, por meio do fracionamento bioguiado do extrato acetato de etila oriundo da partição líquido-líquido do meio fermentativo da actinobactéria em caldo SC (10 g de amido solúvel, 2 g KNO₃, 2 g K₂HPO₄, 2 g NaCl, 0,3 g tryptona-I, 0,05 g MgSO₄, 0,02 g CaCO₃ e 0,01 g FeSO₄ em 1 litro de água estéril). O fracionamento levou ao isolamento do macrotetrolídeo dinactina (**2**) (Figura 5), que era inédito para essa espécie.

Outro trabalho envolvendo o estudo bioguiado da atividade citotóxica de cepas do gênero *Streptomyces*, em combinação com a desreplicação dos extratos por RMN ¹H e com a espectrometria de massas, resultou nos compostos dinactina (**2**), nonactina (**3**) e monactina (**4**) (Figura 5). Estes foram isolados e testados quanto à inibição da proliferação da linhagem de célula de câncer do ovário A2780,

resultando nos valores de IC₅₀ de 0,16, 0,13 e 0,26 μM, respectivamente (RAKOTONDRAIBE *et al.*, 2015).

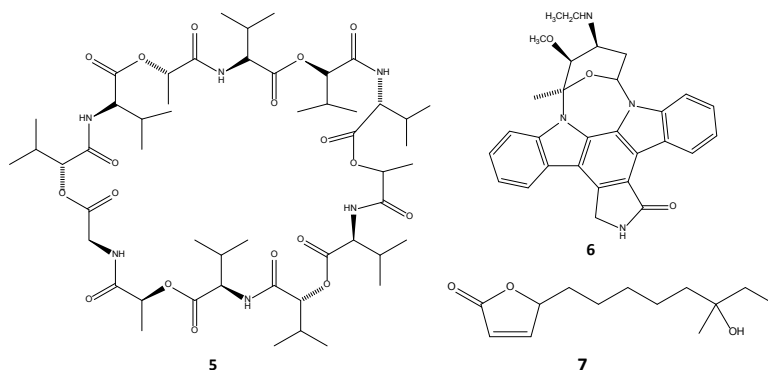
Figura 5 – Estruturas químicas dos compostos 2-4



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

O fracionamento bioguiado de extratos de cepas de bactérias marinhas do gênero *Streptomyces*, isoladas de esponjas, levou ao isolamento do depsipeptídeo valinomicina (**5**), do alcaloide indocarbazólico estaurosporina (**6**) e de um butenolídeo (**7**) (Figura 6). Esses compostos tiveram a atividade antiparasitária testada com bons resultados contra os parasitas *Leishmania major* e o *Trypanosoma brucei brucei* causadores da leishmaniose e da doença do sono, respectivamente (PIMENTEL-ELARDO *et al.*, 2010).

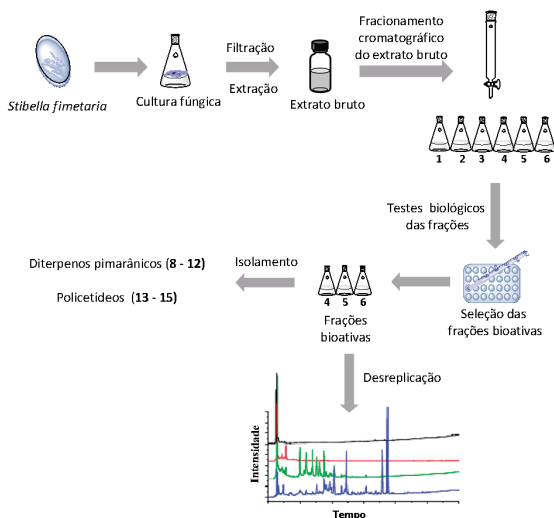
Figura 6 – Estruturas químicas dos compostos 5-7



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

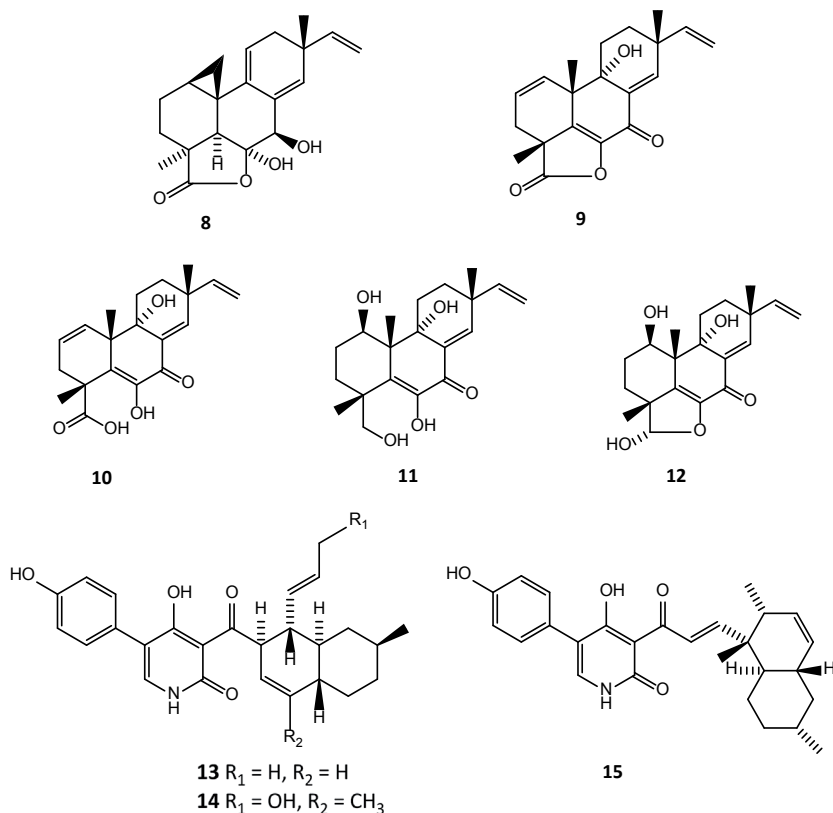
O isolamento de moléculas bioativas a partir de estudos bioguiados de produtos naturais pode ser associado às técnicas modernas de desrepliação, a fim de prevenir o reisolamento e a recaracterização de compostos bioativos isolados anteriormente. Kildgaard *et al.* (2017) combinaram as abordagens de estudo bioguiado e de desrepliação de extratos e frações na obtenção de compostos bioativos do fungo *Stibella fimetaria* IBT 28361 (Figura 7). As atividades citotóxica e antimicrobiana foram investigadas, e a desrepliação foi realizada por meio de análise em UHPLC-DAD-QTOFMS com MS/HRMS em combinação com bibliotecas de MS/HRMS. O extrato acetato de etila do fungo foi fracionado usando-se cromatografia *flash* de fase reversa e um gradiente de eluição com acetonitrila e água de 15% a 100% de acetonitrila. A desrepliação das frações ativas revelou a presença de um peptídeo (peptabióticos), um esteroide (ácido helvólico) e dois policetídeos (ilicicolina H e um derivado). Fracionamentos cromatográficos sucessivos das frações ativas levaram ao isolamento de diterpenos pimarânicos (**8-12**) e do policetídeo ilicicolina H (**13**), já detectado por desrepliação, e de dois derivados desse policetídeo (**14-15**) (Figura 8).

Figura 7 – Esquema de isolamento bioguiado associado a estudo de desrepliação



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

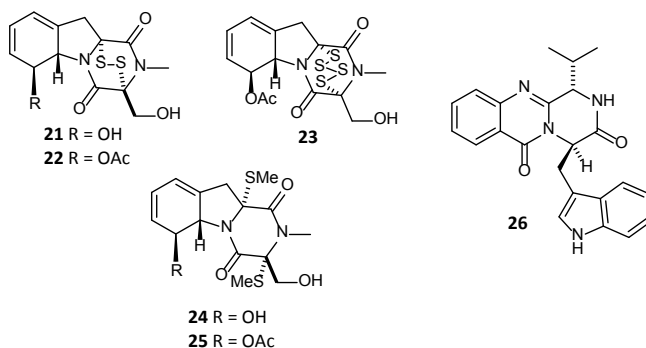
Figura 8 – Estruturas químicas dos compostos 8-15



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

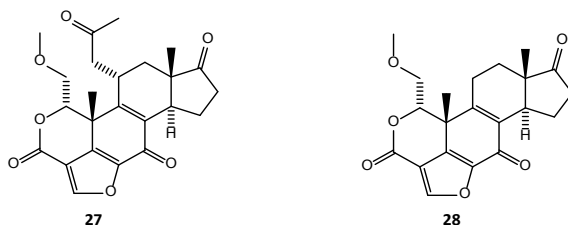
A literatura relata uma enorme variedade de compostos bioativos isolados de fungos marinhos, tanto em relação à diversidade estrutural quanto ao tipo de atividade biológica apresentada. Os fungos estão amplamente distribuídos no ambiente marinho, desde o mar profundo até as calotas polares, habitando todos os tipos de matéria orgânica viva ou morta e os mais variados sedimentos marinhos (IMHOFF, 2016).

Um trabalho realizado por Rodrigues (2014) levou ao isolamento de 83 cepas de fungos oriundos de sedimentos marinhos coletados na costa do estado do Ceará. Os extratos dos cultivos dessas cepas foram testados

Figura 10 – Estruturas químicas dos compostos **21-26**

Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

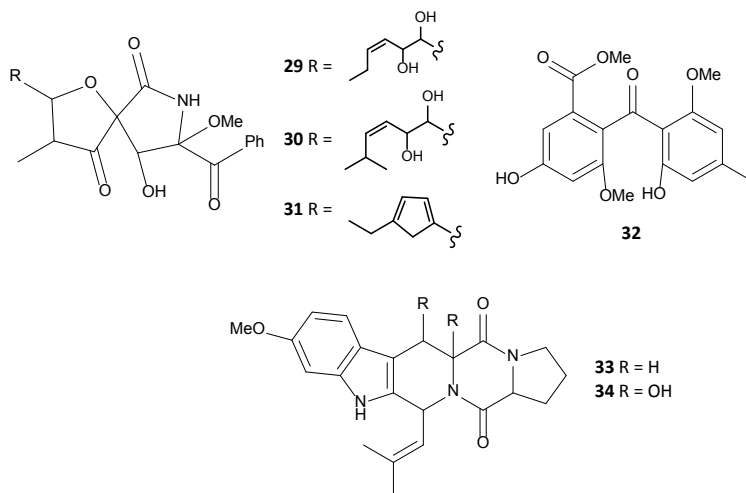
A wortmanina (**27**), um esteroide e inibidor das fosfoinositidas 3-quinases (PI3Ks) (ABLIZ *et al.*, 2015), e a 11-deacetoxiwortimanina (**28**) (Figura 11) foram obtidas após separação bioguiada da cepa BRF053, caracterizada como o fungo *Paecilomyces lilacinus*. A atividade citotóxica de **27** e **28** foi testada contra células de HCT-116, e os resultados de IC₅₀ foram > 25 µg/mL e 5,1 µg/mL, respectivamente. Dessa forma, foi sugerido que a atividade citotóxica das frações testadas anteriormente estava associada à presença de **28**. As frações obtidas do cultivo de *P. lilacinus* foram submetidas à análise por desreplicação via cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, e a comparação com a base de dados do equipamento sugeriu a presença dos compostos ciclosinefungina, estatana A, virescenosideo-D, (+)-esclerotiorina, 2'-amino-2'-deoxiguanosina, fumaramidimicina e deoxinivaleno (FARIAS, 2014).

Figura 11 – Estruturas químicas dos compostos **27** e **28**

Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

O isolamento bioguiado de extratos do fungo *Aspergillus* sp. (BRF030), uma das cepas isoladas do sedimento marinho, levou à obtenção dos compostos pseurotina A (**29**), pseurotina D (**30**), pseurotina FD-838 (**31**), fumitremorgina C (**32**), 12,13-dihidroxifumitremorgina C (**33**), metilsulocrina (**34**) e o bis(detio)bis(metilthio)gliotoxina (**25**) (Figura 12). Após a purificação, a atividade citotóxica contra as células tumorais dos compostos isolados foi avaliada, e os alcaloides indólicos dicetopiperazínicos **33-34** mostraram-se como os mais ativos. A cinética da produção desses alcaloides foi avaliada durante um período de 28 dias, e os tempos de cultivo do fungo que levaram à máxima produção desses compostos foram 14 e 21 dias. Avaliação citotóxica desses extratos também mostrou melhor atividade contra as linhagens tumorais, confirmando a ação dos compostos isolados (SARAIVA *et al.*, 2015).

Figura 12 – Estruturas químicas dos compostos **29-34**

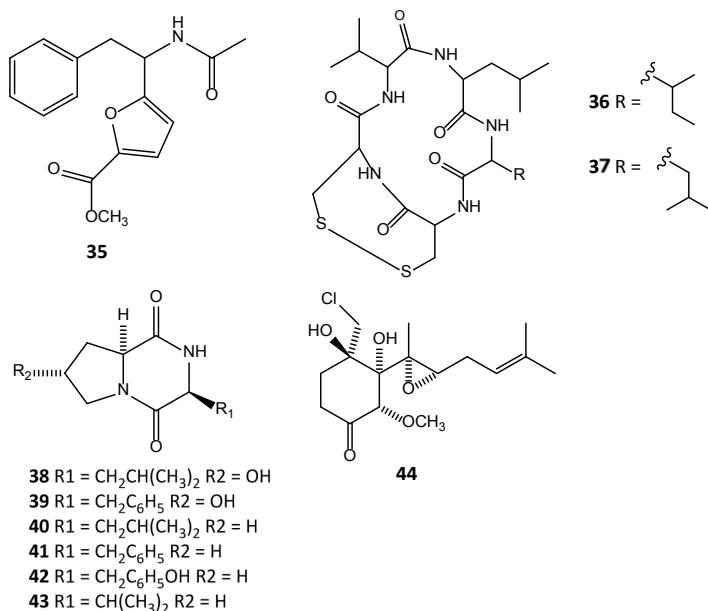


Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

A cepa BRF074, também isolada por Rodrigues *et al.* (2014) e, posteriormente, identificada como *Aspergillus niger*, foi cultivada em três diferentes meios de cultura. Os extratos foram fracionados seguindo resultados de ensaios de atividade preliminares contra células

tumorais. A partir do meio MPDB (malte, peptona e dextrose), foram isolados um éter furânico (**35**), a malformina A1 (**36**) e a malformina C (**37**), enquanto que, a partir do meio PDB (batata e dextrose) e PDYB (batata, dextrose e extrato de levedura), foram obtidos compostos com unidades peptídicas (**38-43**), além da pseurotina A (**29**), da pseurotina D (**30**) e da clovacilina (**44**) (Figura 13). A avaliação citotóxica dos compostos isolados revelou a citotoxicidade de **35** com IC_{50} de 2,9 $\mu\text{g/mL}$, que, em conjunto com a presença de **36** e **37**, justifica a atividade preliminar observada no extrato acetato de etila (UCHOA *et al.*, 2017).

Figura 13 – Estruturas químicas dos compostos **35-44**



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Considerações finais

Apesar de ser uma abordagem promissora, a pesquisa de produtos naturais a partir da metodologia do fracionamento bioguiado não é fácil de ser executada. Esse método de pesquisa requer a colaboração e afinidade entre grupos de pesquisas de áreas diferentes, ou seja, requer

a formação de uma rede interdisciplinar de colaboradores. Geralmente, os químicos de produtos naturais são responsáveis pelo isolamento e purificação dos metabólitos, enquanto a farmacologia (e áreas afins) fica responsável pelos testes de atividades biológicas.

Uma série de etapas devem ser seguidas, de modo que um planejamento entre os grupos parceiros se torna necessário para minimizar as demoras e burocracias que possam existir no decorrer da pesquisa, pois o químico sempre vai estar dependente do resultado farmacológico para executar o próximo passo.

Quanto às frações que não apresentaram atividade no decorrer das triagens, deve-se levar em consideração que essas frações são ensaiadas apenas contra um teste biológico, como citotóxico ou antimicrobiano. No entanto, mesmo sendo um teste citotóxico, o ensaio, geralmente, é feito com umas poucas células cancerígenas, mas existe uma gama de células cancerígenas que podem ser ensaiadas. Da mesma forma acontece com o ensaio antibiótico, se a fração não apresentou atividade para uma determinada cepa, ela pode ser ativa para outras cepas. Entretanto, existem outras atividades a serem testadas além de citotóxica e antibiótica, como as atividades antioxidante e inflamatória. Assim, se uma fração não apresentar atividade na triagem inicial, isso não significa que deve ser descartada.

Referências

ABLIZ, A. *et al.* Wortmannin, PI3K/Akt signaling pathway inhibitor, attenuates thyroid injury associated with severe acute pancreatitis in rats. *International Journal of Clinica & Experimental Pathology*, v. 8, n. 11, p. 13281-13833, 2015.

ANTONIO, T. *et al.* Evaluation of different media for the production of cephalosporins by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, n. 6, p. 819-825, 2012.

APPLETON, D. R.; BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. A simple method for high-throughput extract prefractionation for biological screening. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, v. 61, n. 6, p. 327-331, 2007.

FARIAS, E. X. *Estudo do potencial citotóxico dos metabólitos secundários isolados do fungo marinho Paecilomyces lilacinus recuperado de sedimentos da costa cearense*. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

HE, J. *et al.* Anti-phytopathogenic sesquiterpenoid-xanthone adducts from potato endophytic fungus *Bipolaris eleusines*. *RSC Advances*, v. 9, n. 1, p. 128-131, 2018.

HUSSAIN, A. *et al.* *Streptomyces puniceus* strain AS13., production, characterization and evaluation of bioactive metabolites: a new face of dinactin as an antitumor antibiotic. *Microbiological Research*, v. 207, p. 196-202, 2018.

IMHOFF, J. F. Natural products from marine fungi: still an underrepresented resource. *Marine Drugs*, v. 14, n. 1, 19-37, 2016.

KILDGAARD, S. *et al.* Dereplication and bioguided discovery approach to reveal new compounds from a marine-derived fungus *Stilbella fimetaria*. *Marine Drugs*, v. 15, n. 8, p. 253-272, 2017.

KUMARI, M. *et al.* Antiproliferative and antioxidative bioactive compounds in extracts of marine-derived endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1777-1789, 2018.

LIMA, M. A. S. *et al.* *Aspergillus niger*: a hundred years of contribution to the natural products chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, n. 10, p. 2029-2059, 2019.

MALVIYA, N.; MALVIYA, S. Bioassay guided fractionation: an emerging technique influence the isolation, identification and characterization of lead phytomolecules. *International Journal of Hospital Pharmacy*, v. 2, n. 5, p. 1-6, 2017.

MANSSON, M. *et al.* Explorative solid-phase extraction (E-SPE) for accelerated microbial natural product discovery, dereplication, and purification. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 6, p. 1126-1132, 2010.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. *Química Nova*, v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1/2, p. 57-60, 2005.

PIMENTEL-ELARDO, S. M. *et al.* Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Marine Drugs*, v. 8, n. 2, p. 373-380, 2010.

RAKOTONDRAIBE, L. H. *et al.* Antiproliferative and antiplasmodial compounds from selected *Streptomyces* species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, n. 23, p. 5646-5649, 2015.

RODRIGUES, B. S. *et al.* Bioprospection of cytotoxic compounds in fungal strains recovered from sediments of the Brazilian coast. *Chemistry & Biodiversity*, v. 12, n. 3, p. 432-442, 2015.

RODRIGUES, B. S. *Prospecção de metabólitos secundários citotóxicos oriundos de fungos marinhos isolados de sedimentos do litoral cearense*. 2014. 271 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SAKINAH, R. *et al.* Isolation of bioactive compounds from Indonesian marine *Sponge Clathria* sp., *Xestopongia muta*, and *Endectyon delaubenfelsi* as antibacterial *Escherichia coli*. *Biochemistry & Pharmacology*, v. 7, n. 4, p. 262-265, 2018.

SARAIVA, N. N. *et al.* Cytotoxic compounds from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. recovered from the sediments of the Brazilian coast. *Natural Product Research*, v. 29, n. 16, p. 1545-1550, 2015.

SCHINKE, C. *et al.* Antibacterial compounds from marine bacteria, 2010-2015. *Journal of Natural Products*, v. 80, n. 4, p. 1215-1228, 2017.

SCHNEIDER, H. G.; TENER, G. M.; STRONG, F. M. Separation and determination of antimycins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 37, n. 1, p. 147-157, 1952.

SHOICHET, B. K. Screening in a spirit haunted world. *Drug Discovery Today*, v. 11 n. 13/14, p. 607-615, 2006.

SHUKLA, R. Studies on bioactive compounds from different microorganisms. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, v. 6, n. 6, p. 1225-1233, 2015.

UCHOA, P. K. S. *et al.* New cytotoxic furan from the marine sediment-derived fungi *Aspergillus niger*. *Natural Product Research*, v. 31, n. 22, p. 2599-2603, 2017.

WELLER, M. G. A unifying review of bioassay-guided fractionation, effect-directed analysis and related techniques. *Sensors*, v. 12, n. 7, p. 9181-9209, 2012.

EPIGENÉTICA: uma alternativa para diversificar a produção de metabólitos secundários

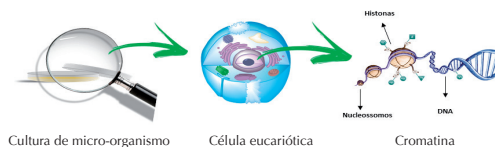
*Davi Dantas Guimarães,
Antônia Torres Ávila Pimenta
e Mary Anne Sousa Lima*

Introdução

A epigenética, uma parte da biologia que significa “acima do genoma”, engloba uma variedade de mudanças hereditárias na expressão gênica, mas que não resulta em uma alteração na sequência de DNA. Envolve modificações estruturais na cromatina decorrentes da interação do indivíduo com o ambiente (BIRD, 2007; ELSNER; SIQUEIRA, 2016; PAIVA *et al.*, 2019).

A cromatina é um complexo macromolecular composto, predominantemente, por DNA, RNA e histonas (um tipo especial de proteína), que se encontra no interior do núcleo das células eucarióticas (presentes em animais, vegetais, fungos e protozoários) (Figura 1) (MICHALAK *et al.*, 2019; REZEK, 2017). É na cromatina que ocorrem os dois principais mecanismos de alterações epigenéticas: a metilação do DNA e a modificação pós-translacional das histonas.

Figura 1 – Representação da estrutura da cromatina, um complexo macromolecular que se encontra no núcleo de células eucarióticas de organismos vivos (ex.: micro-organismos)

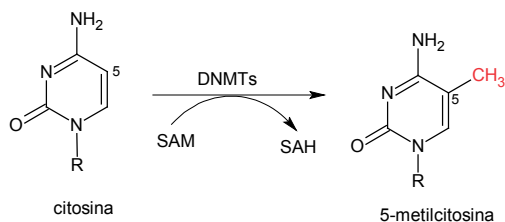


Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Metilação do DNA

É uma modificação química pós-translacional do DNA, onde ocorre a adição de um grupamento metil na posição C-5 do anel da citosina, resultando na formação da 5-metilcitosina (Figura 2).

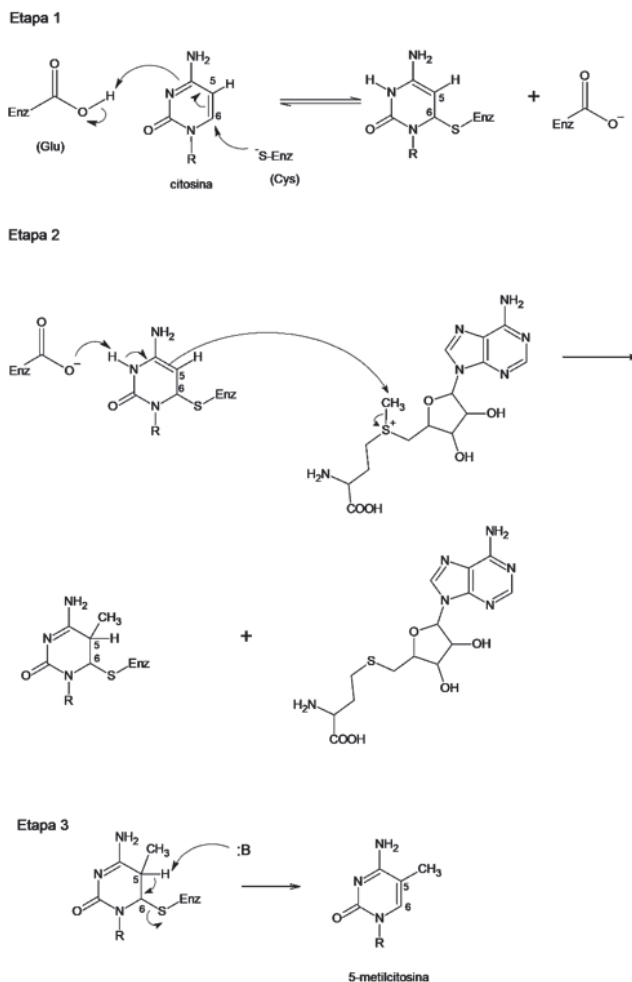
Figura 2 – Metilação do DNA pelas DNA metiltransferases (DNMTs)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Essa adição é realizada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que utilizam *S*-adenosilmetionina (SAM) como agente metilante (SUZUKI; MIYATA, 2006). Na etapa 1 da reação, o grupamento tiol do resíduo da cisteína ataca o C-6 da citosina, formando um intermediário DNA-proteína. Na etapa 2, o grupamento metila da SAM, que se encontra ativada com uma carga positiva no átomo de enxofre, é transferido para o carbono nucleofílico C-5, formando o aduto metilado em C-5 e a *S*-adenosil homocisteína (SAH). Na etapa 3, o H-5 é abstraído por um resíduo básico, ocorrendo uma eliminação β na posição 6, formando, então, a 5-metilcitosina (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismo da metilação do DNA catalisado por DNMTs



Fonte: adaptado de Suzuki e Miyata (2006).

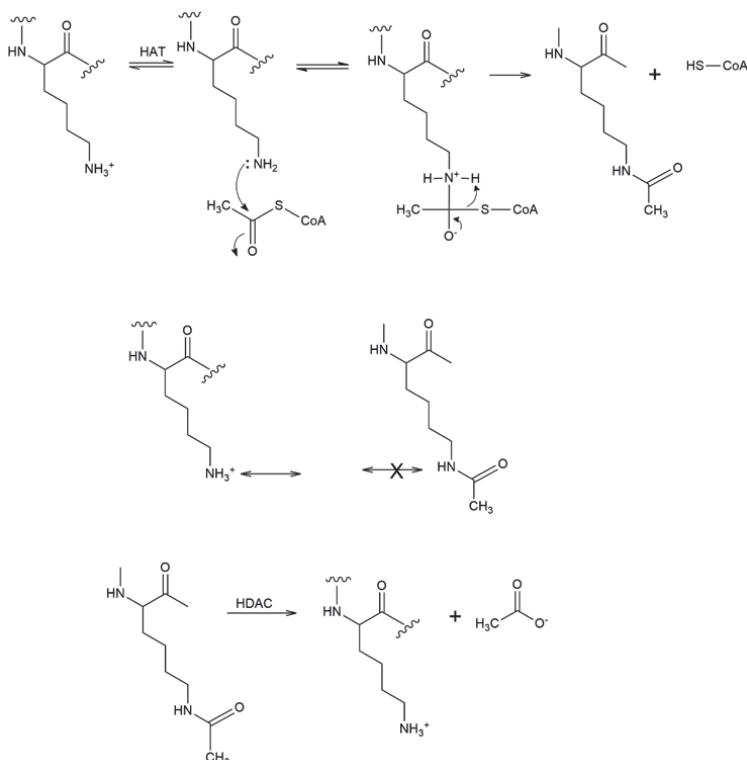
Modificação pós-translacional das histonas

As modificações de histonas podem ser feitas por metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação (CHERBLANC *et al.*, 2013). Entre estas, a acetilação de lisinas presentes nas extremidades das

histonas é uma das mais bem estudadas (CICHEWICZ, 2010) e será abordada neste capítulo.

A reação de acetilação é realizada pelas enzimas histona-acetiltransferases (HTAs) que utilizam acetil coenzima-A como agente acilante. A acetilação dos resíduos de lisina das histonas causa neutralização da carga positiva do grupo amino, diminuindo as interações eletrostáticas entre a histona e o DNA carregado negativamente (Figura 4). Já a desacetilação é feita pelas enzimas histona-desacetiltransferases (HDACs). Essas reações de acetilação e desacetilação alteram a estrutura da cromatina e regulam a expressão gênica, ativando-a e desativando-a, respectivamente (CICHEWICZ, 2010; CHERBLANC *et al.*, 2013).

Figura 4 – Acetilação-desacetilação de histonas

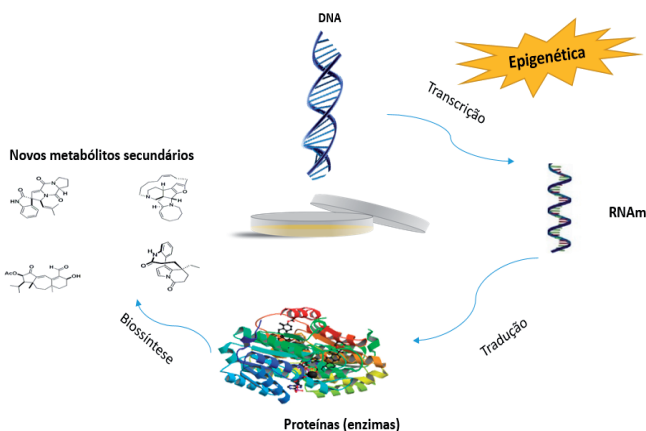


Fonte: adaptada de Cichewicz (2010).

Uso de moduladores epigenéticos para produção de metabólitos secundários de fungos

A Figura 5 mostra o curso da informação genética durante o processo de biossíntese de metabólitos secundários em um micro-organismo, passando pelos processos de transcrição (cópia da sequência de DNA de um gene para produzir uma molécula de RNA), tradução (o reconhecimento das sequências nucleotídicas do RNA mensageiro, correlacionando-as com a sequência que corresponde a determinados aminoácidos) e, por último, a biossíntese dos metabólitos secundários a partir de diversos tipos de reações químicas.

Figura 5 – Curso da informação genética na biossíntese de metabólitos secundários em um micro-organismo



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

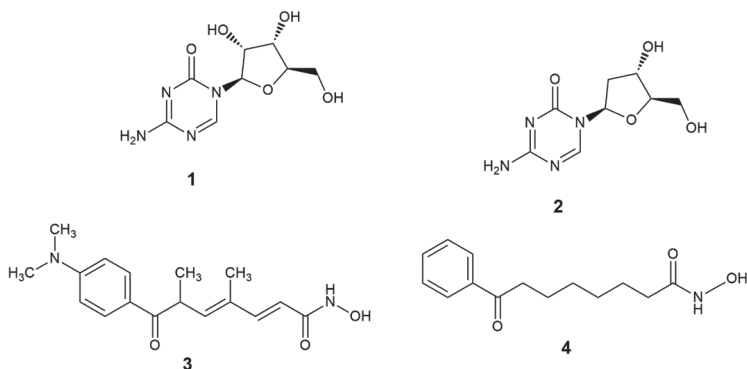
Estudos genômicos mostram que muitos micro-organismos têm um número significativo de vias biossintéticas que codificam o metabolismo secundário, apesar disso, o número de substâncias isoladas a partir desses micro-organismos nos experimentos realizados em laboratório é menor do que o esperado. Isso se deve ao fato de que, em condições laboratoriais, a maioria dos genes biossintéticos dos micro-organismos estaria ausente ou expressa em níveis muito baixos, e os sinais

químicos ou ambientais necessários para ativar essas vias biossintéticas estão ausentes (CHIANG *et al.*, 2011).

Cichewicz (2010) foram os primeiros a sugerir que a produção de metabólitos secundários de fungos poderia ser aumentada pelo emprego de modificadores epigenéticos.

Esses compostos são capazes de interferir nos dois mecanismos principais das alterações epigenéticas discutidos anteriormente, ou seja, alguns são capazes de reverter a metilação do DNA, pela inibição das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), como a 5-azacitidina (AZA) (1) e a 5-aza-2'-deoxicitidina (2), ou pela inibição das enzimas histona-desacetiltransferases (HDACs), como o composto natural tricotasina A (3) e seu derivado sintético, o ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA) (4) (Figura 6). Esses compostos seriam capazes de controlar a expressão de genes silenciados e contribuir para a produção de novas moléculas pelo micro-organismo.

Figura 6 – Exemplos de inibidores das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) e das enzimas histona-desacetiltransferases (HDACs)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Dessa forma, a epigenética vem sendo utilizada como estratégia de manipulação de genes *in situ* com o uso de moduladores químicos, com intuito de acessar metabólitos secundários de caminhos biossintéticos anteriormente silenciados (crípticos) (CICHEWICZ, 2010; GRANT-DOWNTON; DICKINSON, 2006; DIEZ; ROESSLER; GAUT, 2014).

Exemplos de novos metabólitos secundários obtidos a partir do tratamento de fungos com moduladores epigenéticos

O tratamento de uma cepa de *Streptomyces coelicolor* com AZA em diferentes concentrações se mostrou eficiente para ativar rotas biossintéticas anteriormente silenciadas. Os extratos desse micro-organismo haviam sido testados frente a cinco culturas de bactérias patogênicas humanas, observando-se a inibição de três das culturas. Já nos extratos tratados com o agente modulador, foi possível observar a inibição no crescimento de todas as culturas testadas. A análise dos extratos por CLAE revelou que o extrato bruto tratado com AZA apresentou uma maior quantidade de metabólitos secundários do que o controle. A partir desses resultados, fica evidente que a presença do agente modulador estimulou a produção de compostos com potencial antibiótico, que não seriam expressos em condições normais de cultivo (KUMAR *et al.*, 2016).

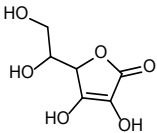
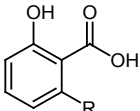
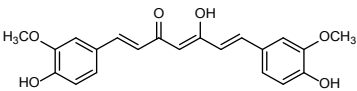
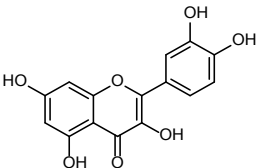
O uso do composto orgânico tricostatina A, que tem propriedades antibióticas e antifúngicas, como modulador epigenético químico em *Aspergillus terreus*, levou à produção de quatro novos meroterpenos, juntamente com nove compostos conhecidos, em comparação ao metabolismo do fungo sem o uso do modulador epigenético. Um desses compostos apresentou atividade citotóxica frente às três linhagens de células cancerígenas (SUN *et al.*, 2018).

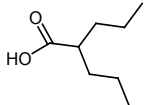
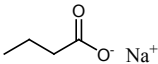
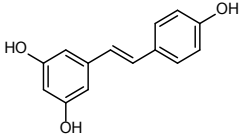
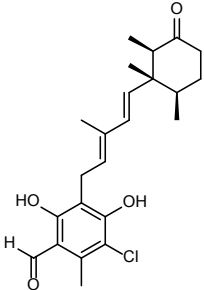
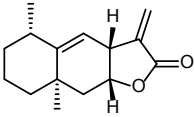
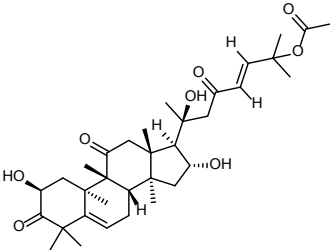
Khan *et al.* (2016) investigaram o efeito de diferentes meios de cultivo contendo moduladores epigenéticos AZA e SAHA, a fim de expressar genes silenciados em uma cepa de *Aspergillus carbonarius* (NRL-369). Os resultados mostraram que os modificadores epigenéticos foram eficazes para a expressão de genes silenciados em condições normais de cultivo, resultando em aumento na produção de metabólitos secundários (KHAN *et al.*, 2016).

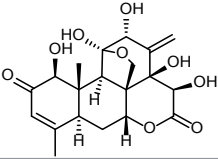
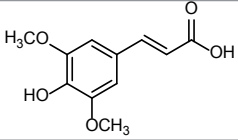
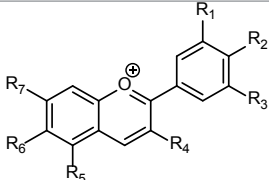
Desde então, vários estudos similares têm sido descritos na literatura, os quais corroboram o emprego de moduladores epigenéticos como uma ferramenta promissora na produção de novos

produtos naturais com implicações na agricultura, nutrição, biologia e doenças humanas, como o câncer e esquizofrenia (BIRD, 2002). Alguns desses moduladores possuem origem natural, como a curcumina (REUTER *et al.*, 2011), quercetina (SHARMA *et al.*, 2016), o ácido anacárdico (RE *et al.*, 2016) e o ácido ascórbico (SHENOY; BHAGAT; NIEVES, 2017), enquanto outros são substâncias sintéticas como o ácido valproico (TARASENKO *et al.*, 2017), SAHA e o AZA. Existem também os sais metálicos, como o butirato de sódio (DAGDEMIR *et al.*, 2016) e o sulfato de cobre (LAU; TAN; XU, 2017). A Tabela 1 mostra exemplos de vários tipos de moduladores epigenéticos com suas estruturas químicas e funções epigenéticas.

Tabela 1 – Moduladores epigenéticos e suas *funções*

Modulador	Estrutura química	Função epigenética	Referência
Ácido ascórbico		Desmetilação do DNA	Shenoy, Bhagat e Nieves (2017)
Ácido anacárdico		Inibição de HATs	Re <i>et al.</i> (2016)
Curcumina		Inibição de HDACs, HATs e DNMTs	Reuter <i>et al.</i> (2011)
Quercetina		Inibição de DNMTs	Sharma <i>et al.</i> (2016)

Modulador	Estrutura química	Função epigenética	Referência
Sulfato de cobre	$\text{Cu}^{2+} \left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{S}-\text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \right]^{2-}$	Alteração do nível de metilação do DNA	Lau, Tan e Xu (2017)
Ácido valpróico		Inibição de HDACs	Tarasenko <i>et al.</i> (2017)
Butirato de sódio		-	Dagdemiir <i>et al.</i> (2016)
Resveratrol		Inibição de HDACs	Levenson, Kumar e Zhang (2014)
Ascoclorina		Inibição de STAT3*	Dai <i>et al.</i> (2015)
Alantolactona		Inibição de STAT3*	Chu <i>et al.</i> (2015)
Curcubitacina B		Inibição de DNMTs e HDACs	Shhukla <i>et al.</i> (2015)

Modulador	Estrutura química	Função epigenética	Referência
Euricomano		Inibição de fosforilação	Hajjouli <i>et al.</i> (2014)
Ácido sinápico		Inibição de HDACs	Saenglee <i>et al.</i> (2016)
Antocianinas		Inibição de DNMTs e HDACs	Mukherjee, Kumar e Ghosh (2015)

Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

*STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)

Referências

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, v. 447, p. 396-398, 2007.

CHERBLANC, F. L. *et al.* Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. *Natural Product Reports*, v. 30, p. 605-24, 2013.

CHIANG, Y. M. *et al.* Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, p. 137-43, 2011.

CHU, L. *et al.* The traditional Chinese medicinal formula BDL301 suppresses tumor growth by inhibiting STAT3 pathway and inducing apoptosis in colorectal cancer cells. *DNA and Cell Biology*, v. 34, n. 3, p. 178-88, 2015.

CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Natural Product Reports*, v. 27, n. 1, p. 11-22, 2010.

DAGDEMIR, A. *et al.* Epigenetic modifications with DZNep, NaBu and SAHA in luminal and mesenchymal-like breast cancer subtype cells. *Cancer Genomics and Proteomics*, v. 13, n. 4, p. 291-304, 2016.

DAI, X. *et al.* Ascochlorin, an isoprenoid antibiotic inhibits growth and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting STAT3 signaling cascade through the induction of PIAS3. *Molecular Oncology*, v. 9, p. 818-833, 2015.

DIEZ, C. M.; ROESSLER, K.; GAUT, B. S. Epigenetics and plant genome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2014.

ELSNER, V. R.; SIQUEIRA, I. R. (org.). *Epigenética aplicada à saúde e à doença: princípios fundamentais baseados em evidências atuais*. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA, 2016. 136 p.

GRANT-DOWNTON, R. T.; DICKINSON, H. G. Epigenetics and its implications for plant biology 2. The “epigenetic epiphany”: epigenetics, evolution and beyond. *Annals of Botany*, v. 97, n. 1, p. 11-27, 2006.

HAIJOULI, S. *et al.* Eurycomanone and eurycomanol from *Eurycoma longifolia* jack as regulators of signaling pathways involved in proliferation, cell death and inflammation. *Molecules*, v. 19, n. 9, p. 14649-14666, 2014.

KHAN, A. A. *et al.* Role of growth media and chemical enhancers in secondary metabolites production from *Aspergillus carbonarius* (NRL-369) and their pharmaceutical potentials. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, n. 4, p. 1223-1230, 2016.

KUMAR, J. *et al.* Epigenetic activation of antibacterial property of an endophytic *Streptomyces coelicolor* strain AZRA 37 and identification of the induced protein using MALDI TOF MS/MS. *PLoS ONE*, v. 11, n. 2, p. 1-12, 2016.

LAU, A. T. Y.; TAN, H. W.; XU, Y. M. Epigenetic effects of dietary trace elements. *Current Pharmacology Reports*, v. 3, n. 5, p. 232-241, 2017.

LEVENSON, A. S.; KUMAR, A.; ZHANG, X. MTA family of proteins in prostate cancer: biology, significance, and therapeutic opportunities. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 33, n. 4, p. 929-942, 2014.

MICHALAK, E. M. *et al.* The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019.

MITCHELL, J. B. *et al.* SIRT1 Directly regulates SOX2 to maintain self-renewal and multipotency in bone marrow-derived mesenchymal stem cells DONG. *Stem Cells*, v. 32, p. 3219-3231, 2014.

MUKHERJEE, N.; KUMAR, A. P.; GHOSH, R. DNA Methylation and flavonoids in genitourinary cancers. *Current Pharmacology Reports*, v. 1, n. 2, p. 112-120, 2015.

PAIVA, J. T. *et al.* Epigenética: mecanismos, herança e implicações no melhoramento animal. *Archivos de Zootecnia*, v. 68, n. 26, p. 304-311, 2019.

PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepitata* and *Chaetomium chiversii* (1). *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 12, p. 1939-1945, 2007.

RE, A. *et al.* Anacardic acid and thyroid hormone enhance cardiomyocytes production from undifferentiated mouse ES cells along functionally distinct pathways. *Endocrine*, v. 53, n. 3, p. 681-688, 2016.

REUTER, S. *et al.* Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. *Genes and Nutrition*, v. 6, n. 2, p. 93-108, 2011.

REZEK, Â. J. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SAENGLLEE, S. *et al.* Cytotoxic effects of peanut phenolics possessing histone deacetylase inhibitory activity in breast and cervical cancer cell lines. *Pharmacological Reports*, v. 68, n. 6, p. 1102-1110, 2016.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 7, n. 9, p. 1753, 2009.

SHARMA, V. *et al.* Sensitization of androgen refractory prostate cancer cells to anti-androgens through re-expression of epigenetically repressed androgen receptor – synergistic action of quercetin and curcumin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 431, p. 12-23, 2016.

SHENOY, N.; BHAGAT, T.; NIEVES, E. Upregulation of TET activity with ascorbic acid induces epigenetic modulation of lymphoma cells. *Blood Cancer Journal*, v. 7, n. 7, e587, p. 1-6, 2017.

SHUKLA, S. Cucurbitacin B alters the expression of tumor-related genes by epigenetic modifications in NSCLC and inhibits NNK-induced lung tumorigenesis. *Cancer Prevention Research*, v. 8, n. 6, p. 552-562, 2015.

SUN, K. *et al.* Corrigendum to “Chemical-epigenetic method to enhance the chemodiversity of the marine algicolous fungus, *Aspergillus terreus* OUCMDZ-2739” [Tetrahedron 74 (2018) 83e87]. *Tetrahedron*, v. 74, p. 6465-6466, 2018.

SUZUKI, T.; MIYATA, N. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. *Current Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 935-958, 2006.

TARASENKO, N. *et al.* Effects of histone deacetylase inhibitory prodrugs on epigenetic changes and DNA damage response in tumor and heart of glioblastoma xenograft. *Investigational New Drugs*, v. 35, n. 4, p. 412-426, 2017.

COCULTURA DE MICRO-ORGANISMOS COMO ALTERNATIVA PARA EXPRESSAR GENES SILENCIADOS

*Maria Vieira de Brito, Francisco Marto Pinto Viana,
Fátima Miranda Nunes e Maria da Conceição Ferreira de Oliveira*

Introdução

Os micro-organismos têm contribuído significativamente para a produção de moléculas (metabólitos secundários) com potencial biológico, tendo como um dos exemplos mais importantes a produção do antibiótico penicilina por um fungo do gênero *Penicillium* (FLEMING, 1929).

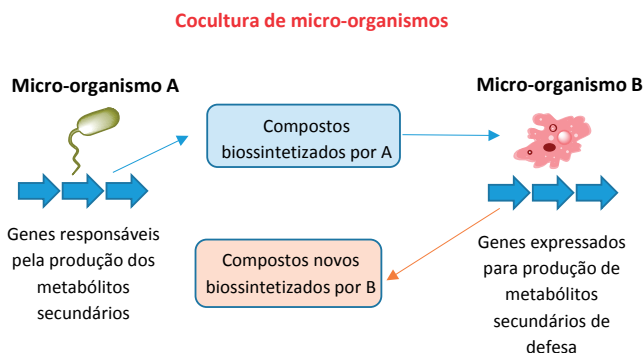
Durante muito tempo, as indústrias farmacêuticas usaram os micro-organismos como fonte de novos compostos em seus programas de desenvolvimento de fármacos. Entretanto, o reisolamento contínuo de metabólitos secundários conhecidos e a redução no isolamento de compostos novos contribuíram para que muitos desses programas fossem encerrados (ZARINS-TUTT *et al.*, 2016).

Estudos do genoma de micro-organismos revelaram que estes têm potencial para produzir um número muito maior de metabólitos secundários do que o isolado até o momento. Esses estudos sugerem que a maioria dos genes envolvidos na biossíntese desses compostos é silenciada ou pouco expressada quando o micro-organismo é cultivado no laboratório (CHIANG *et al.*, 2011). Dessa forma, alguns métodos têm sido

empregados na tentativa de ativar esses genes, denominados de “silenciados”, “órfãos” ou “crípticos”, destacando-se o de **cocultura de micro-organismos** (VIGNESHWARI; ROOPAVATHI; JAYAPRADHA, 2015; ZARINS-TUTT *et al.*, 2016).

Cocultura é o termo empregado para indicar um sistema de investigação de cultura de micro-organismos, no qual duas ou mais espécies podem coexistir em uma relação simbiótica (NAI; MEYER, 2018). Essa pode ser considerada uma metodologia eficaz para produzir metabólitos secundários novos (MARMANN *et al.*, 2014; VIGNESHWARI; ROOPAVATHI; JAYAPRADHA, 2015), os quais são biossintetizados pelas espécies envolvidas como resposta de defesa (Figura 1).

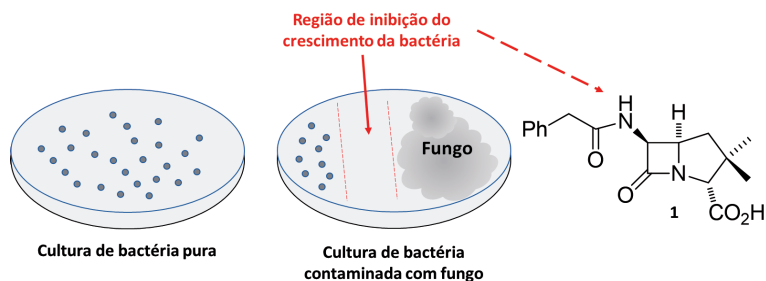
Figura 1 – Representação da cocultura de micro-organismos como metodologia para produzir metabólitos secundários novos como resposta de defesa



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

De fato, as primeiras ideias de cocultura de micro-organismos surgiram ao se observarem as relações antagônicas entre espécies de fungos e bactérias (fungo-fungo, bactéria-bactéria e fungo-bactéria) no mecanismo de controle biológico, que ocorre pela excreção de metabólitos secundários no hábitat em que se encontram (ROSS *et al.*, 2014). A penicilina (**1**), por exemplo, foi descoberta a partir da observação de uma relação antagônica em uma “cocultura não intencional” entre um fungo e uma bactéria (Figura 2) (FLEMING, 1929; VIGNESHWARI; ROOPAVATHI; JAYAPRADHA, 2015).

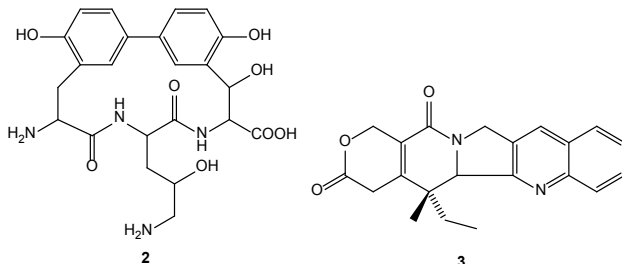
Figura 2 – Representação de uma relação antagonônica entre fungo e bactéria e da estrutura da penicilina (1)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Além de estimular a produção de novos metabólitos secundários, a cocultura também pode aumentar a produção de um determinado composto por um dos micro-organismos. Por exemplo, a produção do antibiótico bifenomicina A (**2**) (Figura 3) pela actinobactéria *Streptomyces griseorubiginosus* (isolado 43708) foi aumentada em até 60 vezes, em relação à cultura pura, quando ela foi cultivada com a bactéria *Pseudomonas maltophilia* (isolado 1928) (EZAKI *et al.*, 1992). Similarmente, a camptotecina (**3**) (Figura 3), um fármaco com atividade citotóxica, foi produzida em concentrações mais elevadas em fermentações mistas (cocultura dos fungos *Colletotrichum fructicola* e *Corynespora cassiicola*) do que em culturas individuais dos micro-organismos (BHALKAR; PATIL; GOVINDWAR, 2016).

Figura 3 – Representação estrutural da bifenomicina A (**2**) e da camptotecina (**3**)



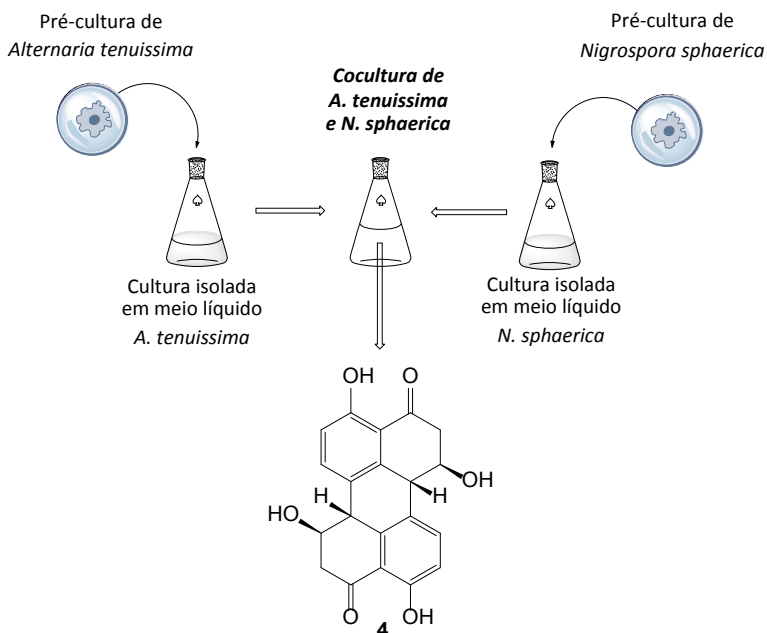
Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

A seguir, serão apresentados alguns exemplos de coculturas de micro-organismos na produção de metabólitos secundários novos ou de interesse particular, os quais foram separados pelos tipos de micro-organismo envolvidos (fungo-fungo, fungo-bactéria e bactéria-bactéria).

Cocultura fungo-fungo

O estudo da cocultura de isolados de *Alternaria tenuissima* e *Nigrospora sphaerica* revelou alterações relevantes na produção de metabólitos secundários em comparação com os resultados do cultivo individual de cada fungo. Do experimento de cocultura foram identificados cinco policetídeos, sendo o estenfiperilenol (**4**) (Figura 4) identificado exclusivamente nesse experimento (CHAGAS; DIAS; PUPO, 2013).

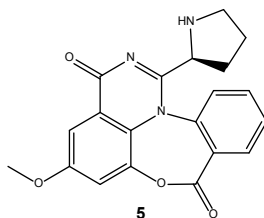
Figura 4 – Representação da cocultura dos fungos *Alternaria tenuissima* e *Nigrospora sphaerica* e da estrutura do composto **4**, produzido exclusivamente no experimento de cocultura



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Experimentos de cocultura envolvendo fungos do mesmo gênero também foram descritos na literatura. A cultura mista de dois isolados de *Aspergillus* (isolados FSY-01 e FSW-02) de origem marinha levou à produção de um alcaloide novo, a aspergicina (5) (Figura 5) (ZHU *et al.*, 2011).

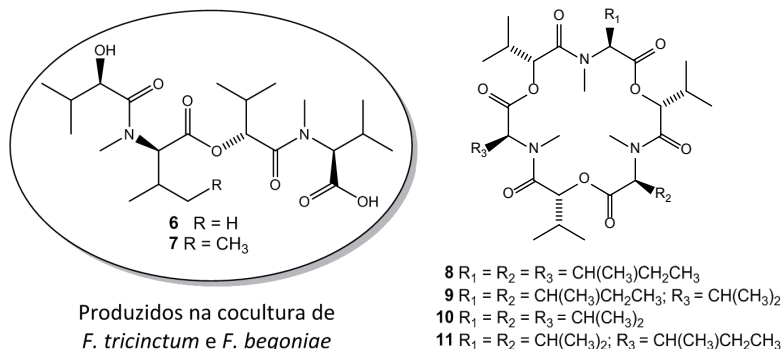
Figura 5 – Representação estrutural do alcaloide aspergicina (5)



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Outro exemplo que apresentou excelente resultados foi o da cocultura de dois isolados do gênero *Fusarium* (*F. tricinctum* e *F. begoniae*). Nesse experimento, dois depsipeptídeos lineares novos, *subenniatis* A (6) e B (7) (Figura 6), foram produzidos somente quando os dois micro-organismos estavam em condições de cocultura. Curiosamente, esses compostos são considerados precursores de quatro depsipeptídeos cíclicos (8-11) produzidos pelo fungo *F. tricinctum* no cultivo isolado (WANG *et al.*, 2013).

Figura 6 – Representação estrutural dos compostos 6 e 7, isolados exclusivamente no experimento de cocultura de *Fusarium tricinctum* *F. begoniae*, e de 8-11, produzidos pelo fungo *F. tricinctum* no cultivo isolado



Produzidos na cocultura de
F. tricinctum e *F. begoniae*

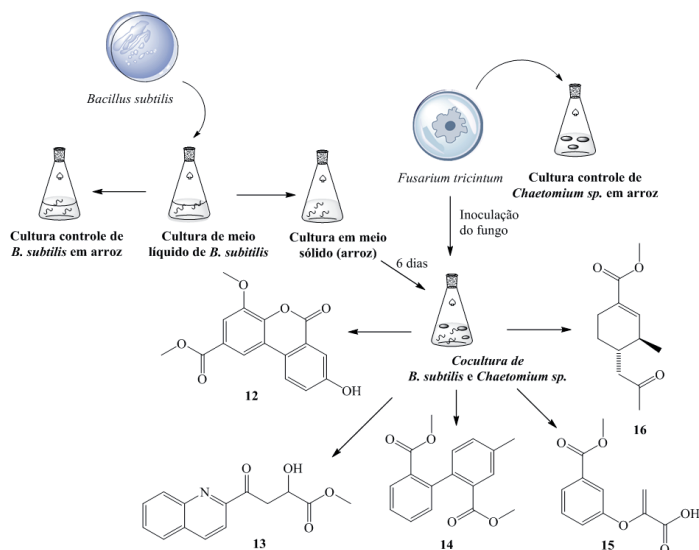
Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Cocultura fungo-bactéria

Experimentos de cocultura envolvendo fungos e bactérias têm se mostrado mais promissores que os estudos similares com coculturas fungo-fungo. Essa estratégia tem sido empregada no desenvolvimento de novos antibióticos para combate de infecções causadas por colônias mistas ou simples de micro-organismos e resistentes aos fármacos comerciais (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010; FREY-KLETT *et al.*, 2011).

Como primeiro exemplo, cita-se a cocultura do fungo endofítico *Chaetomium sp.* com a bactéria *Bacillus subtilis*. Esse experimento favoreceu o isolamento de cinco novos compostos **12-16** (Figura 7), não identificados nas culturas individuais desses micro-organismos. Todos os compostos foram testados em ensaios de antibiose e de atividades citotóxica. Apenas o composto **12** exibiu atividade moderada contra *B. subtilis* (CIM de 53 μ M). No entanto, um excelente resultado de inibição (IC_{50} 1 μ M) da linhagem de célula de linfoma de rato (L5178Y) foi observado para esse mesmo metabólito secundário (AKONE *et al.*, 2016).

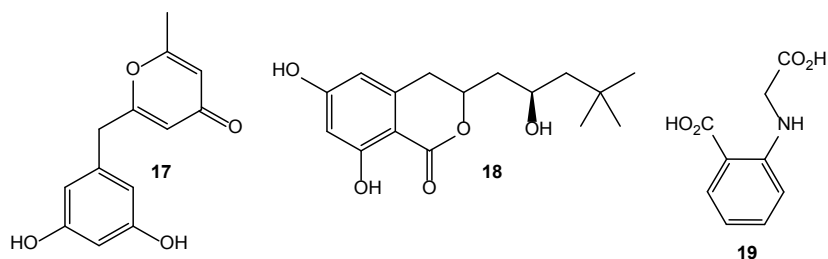
Figura 7 – Representação da cocultura do fungo endofítico *Chaetomium sp.* com a bactéria *Bacillus subtilis* e das estruturas dos compostos **12-16**



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Outro experimento de cocultura usando *B. subtilis* mostrou a influência no metabolismo de *F. tricinctum*. Desse experimento foram identificados três novos produtos naturais (**17-19**) (Figura 8), os quais não tinham sido identificados nas culturas individuais desses micro-organismos. Os compostos foram submetidos a ensaios de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas foram inativos na concentração testada (OLA *et al.*, 2013).

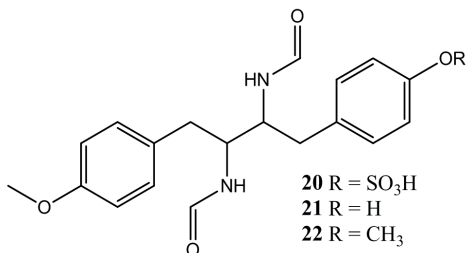
Figura 8 – Representação estrutural dos compostos **17-19**, isolados da cocultura de *B. subtilis* com *Fusarium tricinctum*



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

O experimento de cocultura do fungo *Aspergillus fumigatus* com a actinobactéria *Streptomyces peucetius* levou ao isolamento de três diformamidas inéditas (**20-22**) (Figura 9), sendo uma sulfatada (**20**) (ZUCK; SHIPLEY; NEWMAN, 2011).

Figura 9 – Representação estrutural das diformamidas **20-22**, isoladas no experimento de cocultura do fungo *Aspergillus fumigatus* com a actinobactéria *Streptomyces peucetius*

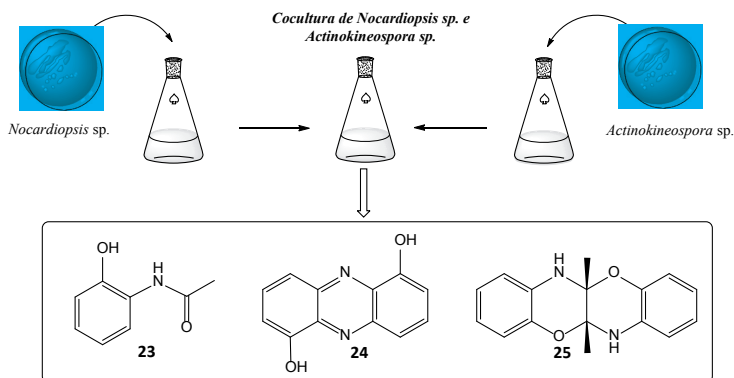


Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Cocultura bactéria-bactéria

As bactérias marinhas *Nocardiopsis* sp. e *Actinokineospora* sp., isoladas das esponjas *Dysidea avara* e *Sphaciospongia vagabunda*, respectivamente, foram cultivadas em cocultura e isoladamente. Os compostos **23-25** foram produzidos exclusivamente no experimento de cocultura, sendo o **25** inédito na literatura (DASHTI *et al.*, 2014).

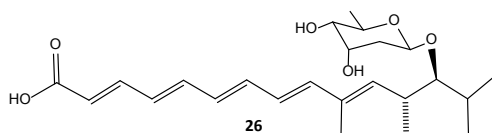
Figura 10 – Representação da cocultura das actinobactérias marinhas *Nocardiopsis* sp. e *Actinokineospora* sp. e das estruturas dos compostos **23-25**



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

A investigação do extrato metanol da cocultura e das culturas isoladas das actinobactérias *Gordonia* sp. e *Streptomyces tendae* revelou a presença do ácido gordônico (**26**) (Figura 11) somente na cocultura. Esse composto, que é um policetídeo glicosídeo, foi pela primeira vez descrito na literatura.

Figura 11 – Representação da estrutura do composto **26**, produzido exclusivamente no experimento de cocultura das actinobactérias *Gordonia* sp. e *Streptomyces tendae*



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Referências

- AKONE, S. H. *et al.* Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomiium sp.* through fungal-bacterial co-culture and epigenetic modification. *Tetrahedron*, v. 30, n. 41, p. 1-8, 2016.
- BERTRAND, A. *et al.* *De novo* production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *Journal of Natural Products*, v. 76, n. 6, p. 1157-1165, 2013.
- BHALKAR, B. N.; PATIL, S. M.; GOVINDWAR, S. P. Camptothecine production by mixed fermentation of two endophytic fungi from *Nothapodytes nimmonicina*. *British Mycological Society*, v. 120, n. 6/7, p. 873-883, 2016.
- CHAGAS, F. O.; DIAS, L. G.; PUPO, M. T. A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. *Journal of Chemical Ecology*, v. 39, n. 10, p. 1335-1342, 2013.
- CHIANG, Y.-M. *et al.* Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, p. 137-143, 2011.
- DASHTI, Y. *et al.* Production of induced secondary metabolites by a co-culture of sponge-associated actinomycetes, *Actinokineospora sp.* EG49 and *Nocardopsis sp.* RV163. *Marine Drugs*, v. 12, n. 5, p. 3046-3059, 2014.
- EZAKI, M. *et al.* Biphenomycin A production by a mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 12, p. 3879-3882, 1992.
- FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *The British Journal of Experimental Pathology*, v. 10, p. 226-236, 1929.
- FREY-KLETT, P. *et al.* Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental and food microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 4, p. 583-609, 2011.

MARMANN, A. *et al.* Co-cultivation: a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine Drugs*, v. 12, n. 2, p. 1043-1065, 2014.

NAI, C.; MEYER, V. From axenic to mixed cultures: technological advances accelerating a paradigm shift in microbiology. *Trends in Microbiology*, v. 26, n. 6, p. 538-554, 2018.

OLA, A. R. B. *et al.* Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, v. 76, n. 11, p. 2094-2099, 2013.

PARK, H. B. *et al.* Gordonic acid, a polyketide glycoside derived from bacterial coculture of *Streptomyces* and *Gordonia* species. *Journal of Natural Products*, v. 80, n. 9, p. 2542-2546, 2017.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 5, p. 340-349, 2010.

ROSS, C. *et al.* Biosynthesis of antifungal and antibacterial polyketides by *Burkholderia gladioli* in coculture with *Rhizopus microspores*. *Mycoses*, v. 57, p. 48-55, 2014.

VIGNESHWARI, R.; ROOPAVATHI, A. S.; JAYAPRADHA, R. Cocultivation-powerful tool for the production of secondary metabolites. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 5, p. 481-485, 2015.

WANG, J. P. *et al.* Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begonia*. *Tetrahedron Letters*, v. 54, n. 20, p. 2492-2496, 2013.

ZARINS-TUTT, J. S. *et al.* Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. *Natural Product Reports*, v. 33, p. 54-72, 2016.

ZHU, F. *et al.* Aspergicin, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 47, p. 767-769, 2011.

ZUCK, K. M.; SHIPLEY, S.; NEWMAN, D. J. Induced production of *N*-formyl alkaloids from *Aspergillus fumigates* by co-culture with *Streptomyces peucetius*. *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 7, p. 1653-1657, 2011.

FERRAMENTAS E ESTRATÉGIAS PARA A EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Josiane Bezerra da Silva Lobão e Eduardo Henrique Silva Sousa

Introdução

Com os avanços da biologia molecular¹ e da engenharia genética mediante a descoberta do funcionamento e uso de enzimas, como a transcriptase reversa,² a DNA polimerase e as enzimas de restrição,³ bem como da reação de PCR (*polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase)⁴ e da manipulação de plasmídeos,⁵ foi possível o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante. O primeiro plasmídeo recombinante foi produzido na década de 70,

¹ Biologia molecular: ramo da Biologia que estuda o desenvolvimento dos seres vivos a nível molecular, com foco no estudo da estrutura, composição e função, inclusive do material genético.

² Transcriptase reversa se trata de uma enzima que utiliza uma sequência de RNA como molde para a síntese de uma fita de DNA complementar.

³ Enzima (proteína) que reconhece uma sequência específica de DNA e quebra as ligações fosfodiéster, rompendo a dupla fita, entre nucleotídeos específicos.

⁴ Enzima ou proteína que catalisa a adição de desoxirribonucleotídeos complementares a uma fita molde de DNA, sintetizando a fita complementar do DNA (cDNA) seguindo a direção 5' → 3'.

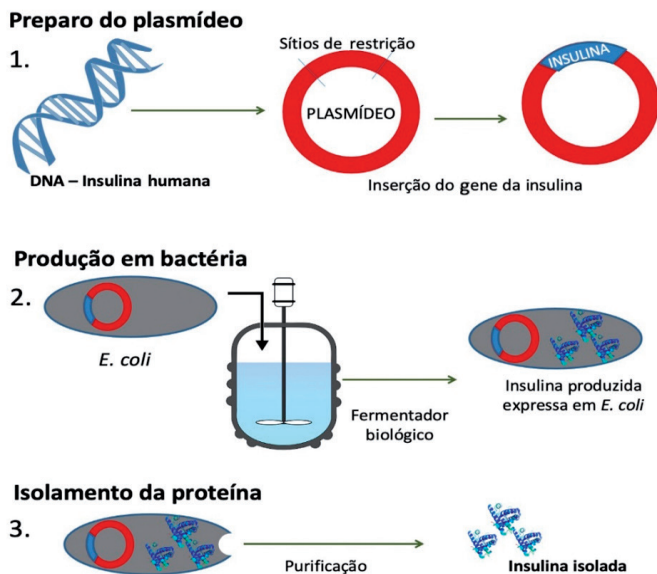
⁵ Molécula de DNA circular extracromossomal capaz de se autorreplicar.

quando S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer e R. B. Helling, pela primeira vez, transferiram um gene de um organismo para outro, mostrando que a informação genética de diferentes origens pode ser transferida para a criação de uma nova estrutura genética capaz de se autorreplicar (COHEN *et al.*, 1973). A fusão de um fragmento de DNA a um vetor de clonagem⁶ origina um DNA recombinante, o qual pode ser inserido em um hospedeiro, como, por exemplo, bactérias, fungos ou mamíferos. Esse processo pode produzir alterações genéticas com o intuito de melhorar as características bioquímicas e fisiológicas do hospedeiro ou de utilizar-se de seu maquinário biológico para produzir moléculas de interesse comercial, como é o caso da produção industrial de proteínas, por exemplo, o da insulina humana (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

De modo simplificado, são necessários três passos para a obtenção do produto biotecnológico de interesse, ou seja, a proteína recombinante planejada: (1) deve-se conhecer a sequência de DNA a ser clonada, por exemplo, a sequência do DNA que codifica a produção da insulina, a qual deve ser inserida em um plasmídeo (obtenção do clone). Esse gene deverá ser previamente preparado, ou seja, amplificado por PCR, usando-se como molde (*template*) o DNA genômico ou o cDNA, a depender do organismo, com objetivo de, posteriormente, prepará-lo para a inserção em um plasmídeo. Em seguida, (2) o plasmídeo contendo o gene de interesse deve ser inserido em um organismo capaz de replicá-lo e de decodificar a informação genética clonada, sendo necessário fazer o crescimento desse organismo para a produção da proteína de interesse (exemplo, a insulina). Por fim, (3) técnicas de purificação devem ser empregadas para o isolamento do produto de interesse (Figura 1).

⁶ Vetor de clonagem é uma molécula de DNA capaz de receber um fragmento de DNA (DNA inserto), com a finalidade de ser replicado/amplificado em certo hospedeiro.

Figura 1 – Etapas simplificadas para a obtenção de um produto gênico utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante, com a proteína insulina como exemplo



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

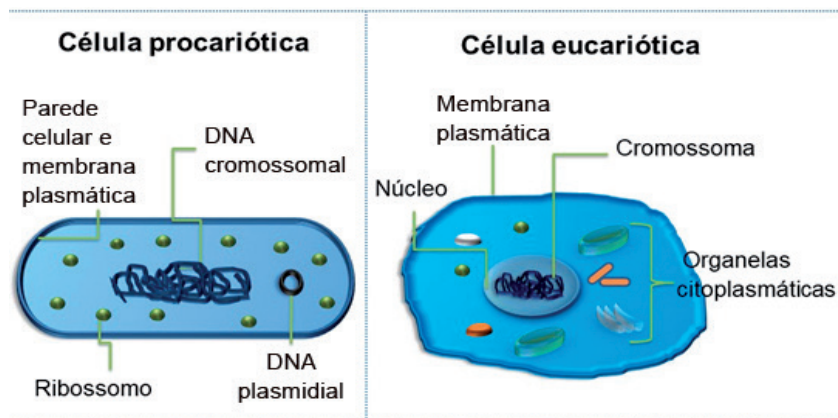
(1) Preparo do vetor plasmidial, com inserção do gene que codifica a proteína insulina. (2) Produção da proteína insulina pela bactéria *E. coli*. (3) Isolamento da proteína insulina pelo rompimento das células e purificação da proteína.

A tecnologia do DNA recombinante, associada às diversas técnicas de isolamento e purificação, tem sido utilizada para facilitar a produção biológica em escalas maiores de compostos que ocorrem naturalmente em pequenas quantidades, como, por exemplo, metabólitos secundários (compostos de baixo peso molecular) e proteínas/enzimas (macromoléculas), e também a própria produção de plasmídeos. Convém ressaltar que o produto gênico de interesse deste capítulo em particular são as proteínas. Dessa forma, essa tecnologia é uma ferramenta poderosa para a produção de proteínas a partir de clones de seu gene, e, para tal, é bastante comum utilizar a célula de um hospedeiro, a exemplo de um micro-organismo procariótico (como bactérias), para expressá-las. Outros hospedeiros podem ser usados, tais como leveduras

(por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) e células de organismos mais complexos (como célula de inseto Sf9, célula de ovário de hamster chinês CHO). Assim, é indispensável o conhecimento dos mecanismos básicos que regulam a expressão⁷ de genes nesse organismo, bem como sua compatibilidade com o plasmídeo empregado na clonagem (GLICK; PASTERNAK, 1998).

Em contraste com uma célula eucariótica, que mantém seu DNA cromossômico envolvido pela membrana nuclear, uma célula procariótica possui seu material genético em contato direto com o citoplasma, dispondo de uma estrutura global bem mais simples (Figura 2).

Figura 2 – Representação simplificada de uma célula proveniente de um organismo procariótico e outro eucariótico



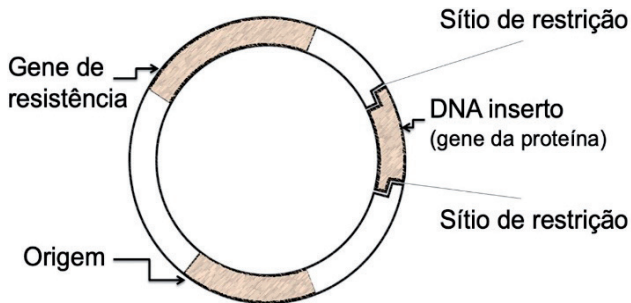
Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

O material genético bacteriano é composto, geralmente, por grandes cromossomas circulares, chamados de DNA genômico, e a maioria apresenta ainda outras moléculas de DNA circular muito menores, chamadas de plasmídeos. Os plasmídeos são transferidos de uma célula bacteriana para outra durante o processo de reprodução e conferem novas características fenotípicas na célula filha. Por exemplo, ao se transferir um

⁷ Termo empregado para indicar a produção de uma proteína pela decodificação de seu gene.

plasmídeo resistente a um antibiótico para uma célula que naturalmente não apresenta essa resistência, esta última passará a apresentar essa nova característica, e sua replicação não será mais afetada por aquele determinado antibiótico. Um plasmídeo modificado desenvolvido no laboratório (“engenheirado”), também conhecido como vetor ou plasmídeo recombinante (Figura 3), pode ser usado como um vetor de clonagem. Essa é uma das vias empregadas para se introduzir em uma bactéria uma nova informação genética. Esse plasmídeo possui, de maneira geral, uma origem de replicação,⁸ um gene de resistência a um antibiótico, como, por exemplo, de resistência à ampicilina, e um sítio de inserção de genes (sítio de múltipla clonagem), capaz de ser reconhecido por um número limitado de enzimas de restrição únicas.⁹ O gene da proteína de interesse (DNA externo) será inserido nesse sítio de clonagem, sendo o responsável pela posterior expressão (produção biológica) de uma nova proteína, geralmente, não encontrada naquele micro-organismo (LEHNINGER, 1977).

Figura 3 – Representação de um plasmídeo recombinante



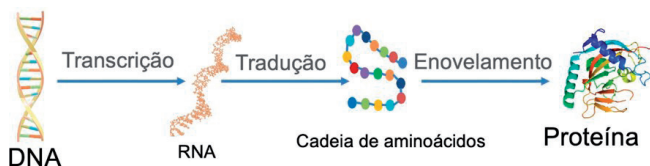
Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

⁸ Origem de replicação: sequência de DNA presente nos plasmídeos que permite que eles se repliquem no decorrer do crescimento da cultura celular. Alguns tipos geram baixo número de cópias dos plasmídeos em cada célula (1-10 cópias do plasmídeo), enquanto outros geram altos números (700-900 cópias do plasmídeo).

⁹ Enzimas de restrição são nucleases, que podem ser consideradas ferramentas biotecnológicas usadas para realizar cortes específicos em segmentos de DNA. Com elas, pode-se clivar (cortar) em pontos (sequências de bases) definidos, servindo para remover pedaços do DNA; posteriormente, o plasmídeo sem esse segmento será preenchido com o gene de seu interesse. De maneira simplificada, pode-se pensar essas enzimas como tesouras moleculares para cortar o DNA, algumas com capacidade de cortar somente quando encontram sequências de bases bem definidas.

A expressão de genes em bactérias e eucariotos pode ocorrer de maneira constitutiva (essenciais para o funcionamento básico da célula, são sempre transcritos) ou de maneira induzida (produzida somente quando necessário por meio de uma resposta celular). Quando um gene é expresso de forma induzida significa que, geralmente, aquele produto do gene (proteína) não é necessário até aquele momento; quando, então, a célula necessita daquela proteína, ela será induzida, e ocorre a sua produção. A expressão ocorre de forma regulada, por exemplo, quando o substrato de uma proteína está presente no meio, assim surge a necessidade de processar o substrato, ocorrendo, dessa forma, uma sinalização celular que levará à sua produção e ao uso do substrato. Essa regulação pode ocorrer, basicamente, ao nível dos mecanismos de transcrição, tradução ou pós-tradução (Figura 4), os quais podem ser induzidos ou reprimidos dependendo da sinalização molecular presente na célula (influenciada pelo meio no qual a célula está inserida) (LEHNINGER, 1977). No caso da tecnologia do DNA recombinante, geralmente, os plasmídeos empregados têm sua regulação ao nível de transcrição.

Figura 4 – Esquema das etapas bioquímicas na produção de uma proteína



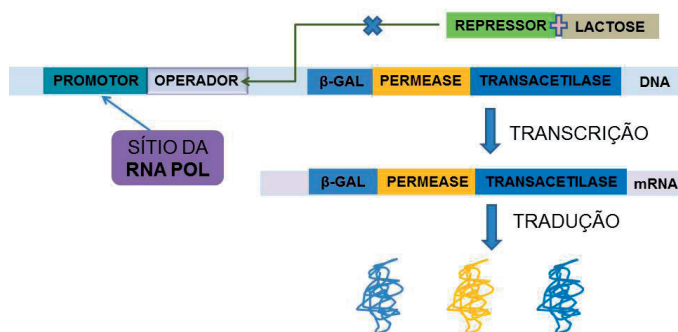
Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Como mencionado anteriormente, na expressão regulada, os produtos gênicos têm seus níveis elevados ou reduzidos em resposta a sinais celulares. Essa regulação pode ser realizada por meio de um *operon*, o qual regula a expressão do transcrito primário (RNA mensageiro), sendo esse processo usado em diversos vetores de expressão empregados na produção de proteínas recombinantes. De maneira simplificada, um *operon*¹⁰ é uma parte da sequência do DNA que antecede o início do

¹⁰*Operon* é um conjunto de genes nos procariontes e em alguns eucariontes, que se encontram funcionalmente relacionados, contíguos e controlados coordenadamente, sendo todos expressos em apenas um RNA mensageiro.

gene a ser regulado e apresenta um sítio ativador, próximo a um promotor (local de ligação da RNA polimerase), um sítio repressor (adjacente ao promotor) e uma sequência codificadora de genes (sequência que dará origem às proteínas). Por exemplo, a bactéria *Escherichia coli* se utiliza de moléculas de glicose, primariamente, para suprir sua necessidade energética. Na ausência de glicose, as células bacterianas podem usar a lactose como fonte alternativa de carbono, e fazem isso por meio da enzima β -galactosidase, a qual é expressa juntamente com outras duas enzimas sob controle do mesmo *operon lac*, para que assim a lactose possa ser catabolizada. Esse mecanismo de regulação da expressão dessas três enzimas ficou conhecido como *operon lac* (Figura 5).

Figura 5 – Esquema simplificado de funcionamento do *operon lac*.



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Na ausência de glicose e presença de lactose, o repressor é impedido de se ligar ao operador, assim a RNA polimerase pode se ligar na região do promotor, dando origem à produção do transcrito primário, que será, posteriormente, traduzido na sequência de aminoácidos correspondente às enzimas que participam do aproveitamento energético a partir da lactose: β -galactosidase (cliva lactose em glicose e galactose), permease de β -galactosídeos (transportador de lactose, importa lactose extracelular para o citosol) e transacetilase de β -galactosídeos (transfere um grupo acetila de acetil-CoA ao β -galactosídeos).

O hospedeiro mais comumente usado para a clonagem gênica é, ainda hoje, a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*). Esse micro-organismo

já foi amplamente estudado, tendo sido investigados diversos detalhes de sua genética, servindo como organismo modelo, conhecendo-se razoavelmente bem toda a cadeia de processos relacionados à sua replicação, transcrição e tradução. Além disso, essa bactéria dispõe de múltiplos e significativos benefícios em relação aos outros sistemas de expressão, como baixo custo, manipulação relativamente fácil e produção rápida e em escala variada. Dessa forma, geralmente, *E. coli* é, ainda hoje, a primeira escolha na produção de proteínas recombinantes, após mais de 40 anos. Todavia, há limitações no seu amplo uso, como na expressão de proteínas mais complexas, como as que sofrem processos de modificação pós-traducionais, a exemplo das glicoproteínas que exigem a incorporação de açúcares após sua produção (FRANCIS; PAGE, 2010; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Aqui focaremos no uso da *E. coli* na produção de proteínas recombinantes.

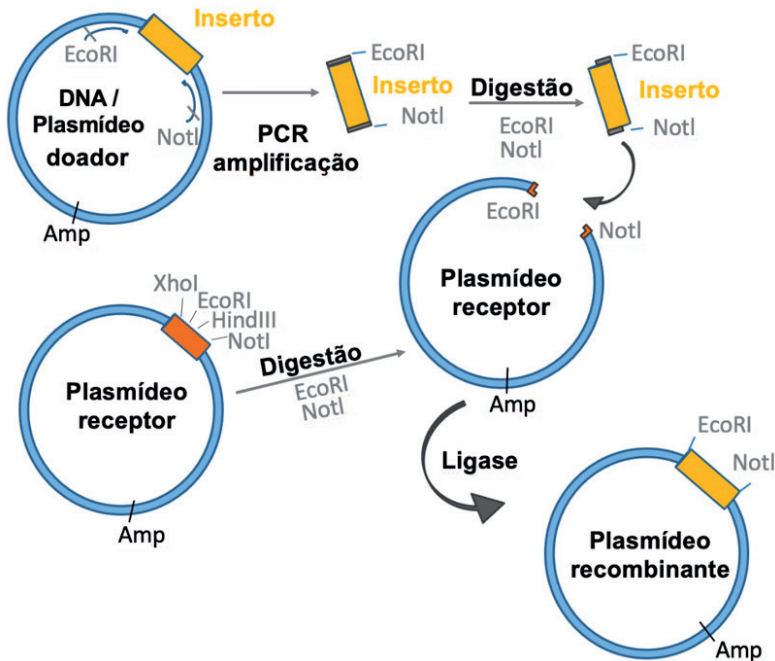
Iniciando o plano de trabalho: preparando seu gene, escolhendo o plasmídeo e a cepa bacteriana

Depois de conhecido o gene que codifica determinada proteína (existem bancos de dados com as sequências de DNA de vários organismos, inclusive humano – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>), pode-se incorporá-lo ao plasmídeo e inseri-lo no micro-organismo que funcionará como hospedeiro, onde será expressa (produzida) a sua proteína de interesse. Plasmídeos são fitas duplas de DNA circular, autorreplicáveis, que as bactérias possuem na forma de DNA extracromossomal. Partindo-se da ideia de expressar uma proteína solúvel (proteínas de membrana também podem ser produzidas) em sua forma completa, deve-se conhecer a sequência de nucleotídeos e seu tamanho. Essas informações poderão ajudar na escolha apropriada do plasmídeo e em etapas futuras, como na purificação.

Inicialmente, são requeridas enzimas de restrição capazes de cortar o DNA em regiões específicas onde o gene de interesse será inserido. Tanto o plasmídeo quanto o DNA inserto são tratados pelas mesmas endonucleases de restrição para que suas extremidades sejam coesivas e possam ser combinadas com maior segurança e na orientação

desejada. Com o suporte da enzima DNA ligase, após o correto pareamento dos pares de bases, as extremidades do vetor e do DNA inserto são ligadas (Figura 6). Essas etapas serão melhor descritas adiante.

Figura 6 – Esquema do processo de preparo e inserção de um gene em um plasmídeo receptor utilizando-se enzimas de restrição (*EcoR* I e *Not*I) e DNA ligase



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Desenhando oligonucleotídeos, amplificação do DNA e alternativas modernas de clonagem

Trabalhando o gene de sua proteína

Consideraremos que o pesquisador já saiba a sequência genética da proteína que irá produzir. Essa sequência pode ser explorada empregando-se o programa gratuito *SerialCloner* (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner-Download.html), sendo possível fazer várias interes-

santes manipulações desse código com esse *software*. Com base nessa sequência de DNA, é possível dispor da sequência de aminoácidos que compõe a sua proteína, seja usando o programa *SerialCloner* para fazer a tradução da sequência de DNA para a sequência de aminoácidos ou em outros sites disponíveis *on-line* (por exemplo, <https://web.expasy.org/translate/>). Algumas informações básicas podem ser obtidas por bioinformática partindo-se dessa sequência de aminoácidos, as quais serão úteis na estratégia de isolamento de sua proteína. Dois *websites*, entre vários outros, podem ser usados para essas informações. Um deles é o *Expasy* (<https://web.expasy.org/protparam/>), no qual é possível obter parâmetros básicos da proteína, tal como massa molar, ponto isoelétrico, composição em números de cada tipo de aminoácidos, entre outros. Outro site sugerido é o *Smart protein* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1), onde é possível ter uma estimativa do domínio da proteína e saber se há algum segmento transmembranar, indicando possíveis problemas para expressar a proteína na forma solúvel, o que exigirá estratégias específicas. Sugerimos que também seja usado o *website Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>), que pode ser de grande valia para uma descrição mais ampla do que se sabe sobre a proteína em questão, caso seja previamente conhecida, mesmo que de outros organismos.

É necessário escolher o vetor de expressão bem no início do processo, o qual deve ser compatível com a célula do hospedeiro, no caso *E. coli*, do contrário, todo esse processo será inútil. Adicionalmente, convém mencionar que nem todo plasmídeo desenvolvido para a bactéria *E. coli*, por exemplo, funciona em qualquer cepa dessa bactéria, e a compatibilidade do vetor com a cepa deve ser sempre checada. Sugere-se verificar nos manuais das empresas que comercializam os plasmídeos, ou mesmo daquelas empresas que fornecem cepas mais específicas. Posteriormente, descreveremos as opções de plasmídeos, mas, antes disso, deve-se preparar o gene para ser inserido no plasmídeo, logo os sítios de clonagem são importantes informações e dependem do plasmídeo. Nesse momento, o que se precisa saber é que, para inserir um gene em um plasmídeo, precisamos usar enzimas de restrição que cortam as sequências em posições específicas, como brevemente mencionado anteriormente (Figura 6). O plasmídeo deve ter no seu sítio de

clonagem essas sequências específicas para que seja inserido o gene. Importante que o gene de sua proteína não contenha internamente sequências que possam ser clivadas (cortadas) pelas enzimas de restrição usadas, de outra forma, inviabilizará a inserção correta do gene.

A fim de evitar que esse problema ocorra, deve-se fazer uma análise dos sítios de restrição e escolher apropriadamente as enzimas que serão utilizadas. Pode-se usar *SerialCloner* ou outros *softwares on-line* (por exemplo, o *NEBCutter V2.0*, da empresa *New England Biolabs*) para analisar a presença de sítios de restrição na sequência do seu gene de interesse. Após essa etapa, é necessário o conhecimento prévio de quais sítios serão usados na clonagem, então deve-se amplificar o gene de seu interesse, inserindo-se nele os sítios de restrição selecionados. Dessa forma, deve-se adicionar na posição 5' (início do gene) a sequência da enzima de restrição selecionada, digamos que seja *NdeI*, logo a sequência CATATG deverá estar contida no início do gene amplificado, enquanto que, para a posição 3' (final do gene), outra sequência de uma segunda enzima deve ser selecionada, por exemplo *HindIII* (AAGCTT). Sabendo-se dessas informações, planejam-se os *primers*¹¹ (oligonucleotídeos) para serem usados na amplificação de seu gene de interesse, empregando-se PCR (reação em cadeia polimerase). Uma vez amplificado, teremos o gene de interesse contendo sequências extras referentes aos sítios de restrição, como ilustrado na Figura 6.

Algumas observações importantes devem ser levadas em consideração para o desenho de *primers* para clonagem:

- Checar o número mínimo de bases a serem inseridas junto aos sítios de clivagem a fim de ter a atividade mais eficiente da enzima de restrição. Para esse propósito, a empresa *New England Biolabs* fornece essas informações em seu *site*. Por exemplo, para clivagem de uma sequência correspondente a *NdeI*, indica-se inserir no mínimo uma

¹¹ *Primer*, do inglês, é um pequeno oligonucleotídeo que serve como molde para parear com uma fita de DNA *template* e para ser usado como sequência iniciadora para a formação de uma nova fita pela reação com a DNA polimerase, sendo assim usado para amplificar um DNA específico.

sequência extra de duas bases (*overhang*, TA) para ótima atividade, enquanto, para *HindIII*, são 4 bases (AGCT).

- Um tamanho de 18-21 pb deve ser suficiente para garantir a eficiência do *primer*, todavia, com a necessidade de inserir os sítios de restrição e alcançar bons Tms (*Temperature of melting* – temperatura de “fusão” ou de desenovelamento), esse *primer* de clonagem pode chegar, eventualmente, a tamanhos maiores (por exemplo, 32 pb).

- Dois *primers* devem ser desenhados tanto para o início quanto para o final do gene, e ambos devem ter Tm o mais próximo possível entre si (usualmente, não mais do que 2 a 4 °C).

- Evitar complementaridade interna.

- O tamanho do *primer* pode mudar para se alcançar uma temperatura de desenovelamento (Tm, *temperature of melting*) apropriada, que, geralmente, deve estar acima de 60 °C. Essa temperatura pode ser estimada em diversos sites *on-line* (como: <http://tmcalculator.neb.com/#!/main>).

- Deve-se inserir ao final das sequências duas bases G e/ou C.

- A inserção no plasmídeo deve ser feita de forma que o códon de iniciação, ATG, esteja presente no gene e que seja bem identificado o códon de finalização, por exemplo, TGA, TAA ou TAG. Todavia, nem sempre deve-se inserir um códon de terminação, particularmente, nos casos em que se deseja inserir *tags* (caudas) ou proteínas fundidas no C-terminal. Nesses casos, ao final dessas extensões, já existe o códon de terminação no próprio plasmídeo. Se seu gene de interesse for inserido nesse plasmídeo com o códon de terminação, então, a sequência complementar dessas caudas não será traduzida e não disporá dessas funcionalidades adicionais, o que pode também ser de seu interesse.

Os *primers* podem ser, geralmente, adquiridos em diversas empresas (IDT, Sigma-Aldrich etc.), que os fornecem liofilizados e desalinizados. Eles devem ser ressuspensos em água ultrapura (tipo milli-Q, *nuclease free*, pH entre 7 e 8), ou em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8, autoclavado). Esses *primers* são, então, alíquotados e estocados a -20 °C e usados de uma só vez, evitando-se

múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento, bem como riscos de contaminação. Em geral, os *primers* direto e reverso são diluídos para uma concentração de 10 μM , sendo ambos usados junto com o DNA *template* (genômico), DNA polimerase, mistura de deoxinucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e tampão nas condições otimizadas para amplificação por PCR.

Alternativamente a esse procedimento, existem outras estratégias em que se utilizam enzimas de recombinação gênica, que não necessitam do uso de enzimas de restrição, para que seja inserido o gene em posição específica no plasmídeo (por exemplo, *in-fusion cloning*, da Takara, ou *gateway recombination cloning technology*, da Thermofisher).

Atualmente, com custo relativo moderado, podem-se encomendar os genes sintéticos, inclusive já inseridos no plasmídeo de seu interesse, em várias empresas (Genscript, Biocat etc.), evitando-se, assim, várias das etapas descritas. Nesse caso, mesmo aqueles laboratórios que não dispõem do DNA genômico para fazer seu PCR, ou mesmo estrutura para realizarem os trabalhos de biologia molecular, podem ainda preparar a proteína de seu interesse. Para isso, basta pesquisar em bancos de genes, ou mesmo buscar a sequência da proteína de seu interesse, e fornecer essa sequência desejada para a empresa. Adicionalmente, essas empresas oferecem também o serviço de otimizar códons para o hospedeiro desejado, abrindo interessantes oportunidades para a clonagem. Além dessas opções, resta ainda o uso de bancos de plasmídeos (por exemplo, Addgene, <http://www.addgene.org/>), em que vários cientistas disponibilizam seus plasmídeos clonados para uso da comunidade científica, sendo possível identificar plasmídeos com diversos genes de interesse. Os custos são extremamente reduzidos (~US\$ 60 - 90). Além disso, os plasmídeos podem ser enviados inclusive já em cepas de *E. coli*.

PCR: Técnica utilizada para a amplificação (produção de múltiplas cópias) de um segmento específico de DNA. Nesse processo, utiliza-se uma DNA polimerase termoestável (por exemplo, taq DNA polimerase), deoxi-nucleotídeos (A, C, G e T) e um *primer* (oligonucleotídeo molde iniciador da síntese de ácidos nucleicos), e, por meio de múltiplos ciclos de desnaturação (desanelamento), renaturação (anelamento) e síntese de DNA (polimerase), pode-se obter uma grande quantidade de réplicas de genes de interesse.

O plasmídeo e a sua seleção

A seleção do plasmídeo é um dos passos críticos para o sucesso na produção de sua proteína, o qual influenciará não somente o rendimento, mas também a qualidade da proteína. Existem algumas características básicas que o plasmídeo deve apresentar para ser usado na célula hospedeira bacteriana e originar rendimentos de proteína satisfatórios:

- Dispor de sítios únicos de enzima de restrição cliváveis por enzimas chamadas de endonucleases de restrição a fim de possibilitar inserção do gene.
- Tamanho adequado para inserção do fragmento de DNA, sendo o tamanho médio utilizado de aproximadamente 3,5 kb (Kilobases).
- Compatibilidade com a cepa bacteriana usada (algumas cepas de *E. coli* podem degradar certos plasmídeos, mesmo sendo plasmídeos apropriados para essa bactéria).
- Estratégia de, seletivamente, isolar e identificar colônias que contêm o plasmídeo, bem como forçar sua manutenção no hospedeiro. Usualmente, emprega-se um gene que confere resistência a um antibiótico (por exemplo, inserindo-se gene da enzima beta-lactamase que degrada a ampicilina).
- Controle de expressão (sistemas de regulação, promotores fracos, moderados ou fortes).

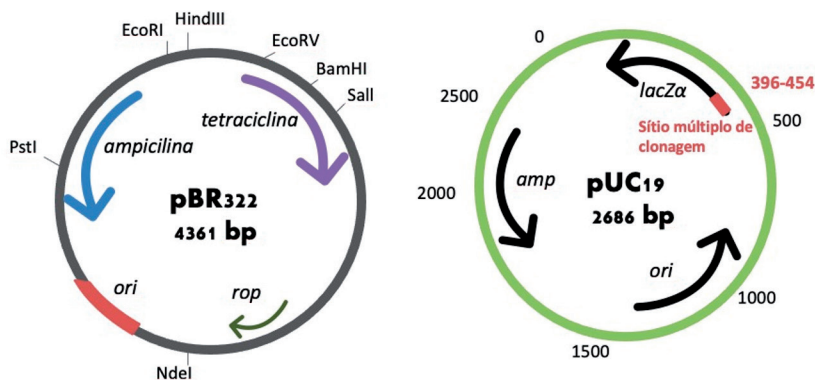
Nesse momento inicial, a ideia é planejar como inserir o gene de sua proteína em um plasmídeo de expressão e qual seria a melhor escolha desse vetor. O primeiro passo é checar se o gene de sua proteína tem sítios únicos de enzima de restrição que fazem parte do sítio de múltipla clonagem do plasmídeo, o que foi previamente mencionado. Por exemplo, o plasmídeo chamado pET20b(+) tem uma região onde o gene exógeno é inserido que contém várias opções de enzimas

de restrição a serem usadas, tais como *Bam*HI, *Eco*RI, *Sac*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I. Cada uma dessas enzimas promove um corte único no DNA plasmidial, numa posição conhecida do vetor, e, se o gene de sua proteína dispuser de alguma sequência que seja reconhecida por essas enzimas, haverá uma clivagem dele, logo aquela enzima (ou sítio no plasmídeo) não poderá ser usada para clonagem. Devem-se usar dois sítios de restrição para inserir o gene exógeno, dessa forma, trata-se o plasmídeo com as enzimas, por exemplo, *Bam*HI e *Not*I, removendo assim o segmento de DNA; em seguida, o gene exógeno, contendo em suas extremidades os sítios já digeridos *Bam*HI e *Not*I, pode ser ligado ao plasmídeo (Figura 6).

Na bactéria *E. coli*, a eficiência de transformação¹² de DNA exógeno diminui significativamente com plasmídeos maiores que 15 kb. O plasmídeo pBR322 é um dos mais antigos, bastante utilizado na década de 80, contém 4.361 pb (pares de bases) e possui dois genes de resistência a antibiótico, um para ampicilina (*Ampr*) e outro para tetraciclina (*Tetr*). Esse plasmídeo possui alguns sítios únicos de reconhecimento para enzimas de restrição *Bam*HI, *Hind*III e *Sal*I no gene *Tetr*, e um único sítio para *Pst*I no gene da *Ampr*, bem como três outros sítios únicos em outras regiões do plasmídeo. Além desses elementos, tem uma origem de replicação que funciona apenas em *E. coli* e que gera um número médio de cópias por célula (10-100). Outro plasmídeo, o pUC19, foi posteriormente desenvolvido, possuindo somente 2.686 pb. Esse plasmídeo contém um gene de resistência à ampicilina, um segmento regulável de β -galactosidase (*lacZ*) do *operon lac* de *E. coli*, um gene *lacI* que produz uma proteína repressora para regular a expressão do *LacZ*, um segmento com múltiplos sítios de clonagem (*Eco*RI, *Sac*I, *Kpn*I, *Xma*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Sal*I, *Pst*I, *Hind*III etc.) e uma origem de replicação possibilitando alto número de cópias (> 100 cópias por célula) (Figura 7). Esse plasmídeo tornou possível a expressão controlada de proteína contendo um *operon lac*, considerado, atualmente, um promotor fraco.

¹²Transformação é o processo de inserção de plasmídeo exógeno em bactéria.

Figura 7 – Mapa dos plasmídeos pBR322 e pUC19



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Atualmente, existem muitos plasmídeos comerciais e outros não comerciais disponíveis para expressão de proteínas em *E. coli*. Pelo menos três diferenças críticas existem: os sítios de múltipla clonagem, o promotor, a existência de sequências fundidas (cauda de histidina, proteína MPB fundida etc.). Esta última, geralmente, utilizada para a purificação da proteína ou melhoria de solubilidade. As diferenças nos sítios de múltipla clonagem são importantes e oferecem assim mais possibilidades de inserção de seu gene. Importante mencionar que não é raro encontrar no gene da proteína de interesse um sítio de restrição idêntico ao encontrado no plasmídeo, o que inviabiliza o seu uso para clonagem, como previamente mencionado.

Descreveremos, brevemente, dois tipos distintos de plasmídeos, bastante utilizados para expressão de proteínas recombinantes, pMAL (NEB) e pET (Merck). O plasmídeo pMAL apresenta alto número de cópias em *E. coli*, dispõe de resistência à ampicilina, sítio múltiplo de clonagem e um promotor do tipo *tac* (promotor híbrido – *trp* + *lac*), considerado, atualmente, moderado para expressão de proteína. Adicionalmente, esse plasmídeo oferece a opção de fundir à sua proteína uma outra proteína chamada de MBP (*maltose binding protein* – proteína de ligação à maltose), que funciona auxiliando

tanto na produção da proteína na forma mais solúvel quanto no isolamento dela usando coluna de afinidade. Infelizmente, o tamanho da proteína fundida (MBP) é expressivo (~42 kDa), o que, em certos casos, é uma limitação por dificultar estudos da proteína de interesse na sua forma isolada. Apesar de ser possível remover a MBP, por meio de um tratamento com proteases específicas, nem sempre esse procedimento é seguro e eficiente. Entretanto, o nível de pureza e os rendimentos de isolamento da proteína de interesse podem ainda justificar o emprego desse sistema. Adicionalmente, tem-se a opção de incorporar uma sequência para promover o transporte da proteína para o periplasma. Essa estratégia pode ser útil para auxiliar o enovelamento apropriado de proteínas cuja expressão no citoplasma apresenta problemas, bem como para proteínas que precisam formar ligações dissulfetos para adequado enovelamento.

Os plasmídeos pET apresentam número bem mais amplo de opções disponíveis, havendo várias séries (pET3, pET20, pET23, pET44 etc.), e usam o forte promotor T7 (NOVAGEN, 2003). As séries oferecem a possibilidade de diferentes sistemas de seleção, envolvendo ampicilina ou canamicina, além de várias sequências fundidas para fins de detecção, purificação e melhoria de solubilidade. As opções de fusão para fins de purificação de proteína usando resinas de afinidade são variadas, tais como as fusões His•Tag, GST•Tag, CBD•Tag™, S•Tag e T7•Tag. Além dessas, há outras estratégias de fusão para facilitar a produção de proteína solúvel, como os casos inserindo Nus•Tag™, Trx•Tag™ e GST•Tag™ (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, 2002-2014). Essas fusões são susceptíveis à remoção por tratamento com proteases seletivas. Outra importante disponibilidade dessas séries é a possibilidade de inserir essas sequências adicionais ou no N-terminal ou no C-terminal de sua proteína e, até mesmo, em segmento interno, o que tem importante implicação. Convém mencionar que algumas proteínas podem ser muito sensíveis quando inserida sequência extra no N-terminal, sendo adequado realizar a fusão no C-terminal, mas isso depende de caso a caso e, muitas vezes, isso é indiferente.

Outro interessante plasmídeo é o pET-Duet (Sigma-Aldrich), e seus similares, em que se faz possível a coexpressão de duas proteínas simultâneas, havendo, inclusive, a possibilidade de se combinarem alguns Duets, com a opção de se expressarem até oito proteínas simultaneamente em *E. coli*. Esses plasmídeos estão sujeitos ao promotor T7, sendo possível inserir também diferentes proteínas de fusão, tais como His-tag e S-tag. Adicionalmente, há opções de resistência a antibióticos, tais como ampicilina e carbenicilina para o pET-Duet, e cloranfenicol para pACYCDuetTM-1, entre outras opções.

Uma vez selecionado o plasmídeo que confere as melhores propriedades para a produção de sua proteína, convém avaliar quais aspectos seriam interessantes para a célula hospedeira.

A cepa bacteriana

Atualmente, dispõe-se de um amplo número de cepas bacterianas de *E. coli*, fornecidas por várias empresas (como Thermofisher, Sigma-Aldrich, Agilent), com peculiaridades relevantes a serem consideradas para o sucesso na produção da proteína de interesse. Há certos genes que apresentam muitos códons raros ou pouco frequentes em *E. coli*, logo a sua expressão em cepas convencionais gera uma baixa produção de proteína, tendo sido desenvolvidas cepas (por exemplo, RosettaTM, Sigma-Aldrich) contendo extras tRNAs para tais casos, auxiliando uma melhor produção de tais proteínas (previamente, mencionamos que o gene sintético poderia ser preparado corrigindo-se esses códons raros como alternativa). A solubilidade da proteína expressa é um dos problemas mais comuns enfrentados, havendo vários casos em que a proteína se encontra insolúvel em corpos de inclusão.¹³ Foram desenvolvidas cepas de *E. coli* (ArcticExpress (DE3), da Agilent) em que se sugerem melhores rendimentos de produção da proteína na forma

¹³ Ainda nessa forma insolúvel, em certos casos, é possível recuperá-la desnaturando a proteína e isolando-a, com rendimentos podendo ser bastante satisfatórios, todavia nem sempre essas proteínas retornam à sua forma funcional.

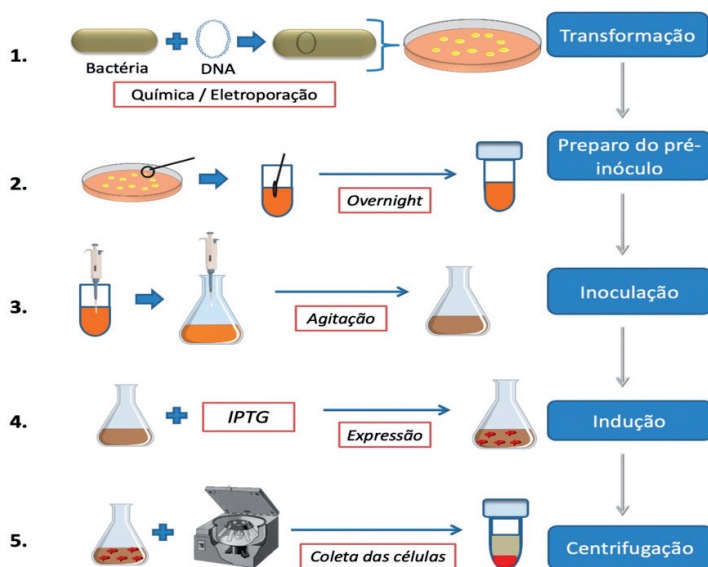
solúvel, seja pela presença de chaperonas¹⁴ (observação: o plasmídeo selecionado tem papel crítico também na produção de proteína solúvel) e pela eficiência de crescimento em baixa temperatura, ou ainda por cepas mais resistentes a proteínas tóxicas (OverExpress™ C41 (DE3), Sigma-Aldrich ou BL21 A1, Thermofisher). Proteínas que precisam formar pontes dissulfeto para que seu enovelamento ocorra de forma correta têm tido uma alternativa de cepa de *E. coli*, tal como a Origami 2 (Sigma-Aldrich), que teve mutações nos genes das enzimas tioredoxina redutase (*trxB*) e glutationa redutase (*gor*). Importante sempre checar se o plasmídeo a ser usado é compatível com a cepa de *E. coli* a ser empregada. O sucesso da expressão de uma proteína depende da combinação de uma seleção apropriada de plasmídeo e cepa e, naturalmente, das condições otimizadas para expressão.

Como um caso de trabalho, podemos citar a cepa de *E. coli* BL21(DE3), considerada uma das mais utilizadas para a produção de proteínas, devido à sua compatibilidade com o promotor T7, sendo preferida para uso com plasmídeo pET, mas também adequada para expressar proteínas provenientes de diversos outros plasmídeos contendo promotores, como *tac*, *lac*, *trc* etc. Adicionalmente, essa cepa é deficiente das proteases *Lon* e *OmpT* no citoplasma, o que deve favorecer a integridade da proteína recombinante. Outras derivações dessa cepa vêm surgindo, auxiliando em casos mais específicos, inclusive algumas previamente mencionadas, como a Origami e Rosetta™.

Expressão da proteína de interesse

Uma vez selecionado e preparado o plasmídeo, bem como escolhida a cepa de *E. coli*, então se procede às etapas de transformação, isolamento de colônia, crescimento, indução e purificação da proteína, como esquematizado na Figura 8.

¹⁴ Proteínas envolvidas em auxiliar no enovelamento apropriado de outras proteínas.

Figura 8 – Esquema de produção de proteína recombinante em *E. coli*

Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Conhecimento prévio de sua proteína

O conhecimento prévio da proteína que se deseja preparar direciona todo o processo de clonagem, expressão e sua purificação. Isso porque existem diversos tipos de proteína, com várias particularidades a serem consideradas, tais como cargas positivas ou negativas, presença de segmentos hidrofóbicos, modificações pós-traducionais de que necessitam (por exemplo, pontes dissulfeto), uso de sequências para isolamento por afinidade, entre outras.

Dados essenciais

Estrutura primária (sequência de aminoácidos); região onde a proteína é expressa, no citoplasma (solúvel), se é proteína transmembranar (lipofílica); presença de cofator (região, em geral, não proteica, essencial para a garantia da função da proteína/enzima).

Dados importantes

Estrutura secundária, terciária e quaternária, se houver; os tipos de domínios que ela apresenta (relacionado ao enovelamento independente de partes da proteína).

Quanto mais informações disponíveis sobre a proteína, melhor, o que poderá facilitar não somente o planejamento da expressão mas também auxiliar em sua purificação. Previamente, discutimos sobre onde obter informações acerca de uma sequência de aminoácidos, o que se faz relevante usar nesse momento. Do ponto de vista experimental, a primeira “etapa de purificação” de uma proteína pode ser considerada uma ótima expressão. Na verdade, isso significa que as etapas de purificação serão mais facilmente alcançadas, pois teremos uma maior proporção da proteína de interesse frente às outras proteínas totais da célula. Caso a expressão seja baixa, todas as etapas seguintes para o seu isolamento serão menos eficientes e sujeitas a maiores dificuldades. Para melhor entendermos a importância de uma ótima expressão nas etapas de purificação de proteínas, devemos compreender que, havendo uma maior proporção da proteína de interesse frente às proteínas totais, teremos mais chances de isolarmos aquela proteína com maior grau de pureza e menos etapas de purificação. Considerando que tenhamos, em valores relativos, 100 de sua proteína de interesse e 20 de outras proteínas celulares e que haja uma eficiência de 20 vezes na remoção de impureza, com uma perda de 5 vezes da proteína de interesse. Nesse caso, ao final desse processo de purificação, teremos 20 de sua proteína de interesse e 1 de impureza, obtendo, assim, uma proteína 95% pura. Todavia, caso não tenhamos uma satisfatória expressão, contaremos com proporção menor da proteína de interesse *versus* as proteínas totais. Por exemplo, poderíamos ter a produção relativa de 25 da proteína de interesse, enquanto mantemos 20 das proteínas totais, considerando que a eficiência dos processos de isolamento se mantenham aproximadamente similares, teremos, ao final, 5 da proteína de interesse e 1 das proteínas totais, resultando numa proteína cerca de 80% pura, claramente com perda de capacidade de purificação, além de menos proteína isolada. Todavia, mesmo essas situações podem ser estrategicamente contornadas para que se tenha sucesso na purificação, por exemplo, incorporando-se sequências para isolamento seletivo por resinas de afinidade, como descrito a seguir.

Após se obter o plasmídeo recombinante, e certificando-se de que a sequência de nucleotídeos inserida realmente corresponde à da

proteína que se deseja expressar, por sequenciamento de DNA (algumas empresas prestam esse serviço), é necessário inseri-lo num organismo capaz de expressar eficazmente a proteína de interesse, no caso que temos descrito aqui seria a bactéria *E. coli*.

ATENÇÃO! Ambiente estéril!

É importante comentar que todas as etapas envolvendo o uso do micro-organismo devem ocorrer em ambiente estéril e com todos os cuidados necessários para se evitar a contaminação do seu sistema (uso de soluções e materiais esterilizados – auto-clavados ou esterilizados por filtros 0,22 µm estéreis –, procedimentos realizados à chama ou em câmara biológica de fluxo, na presença de sistemas de controle e com uso adequado de EPI).

ATENÇÃO! É de extrema importância que o laboratório de manipulação de micro-organismos obedeça às normas de biossegurança adequadas ao trabalho desenvolvido no local e esteja munido do certificado de qualidade emitido pela comissão de biossegurança da instituição regulamentadora.

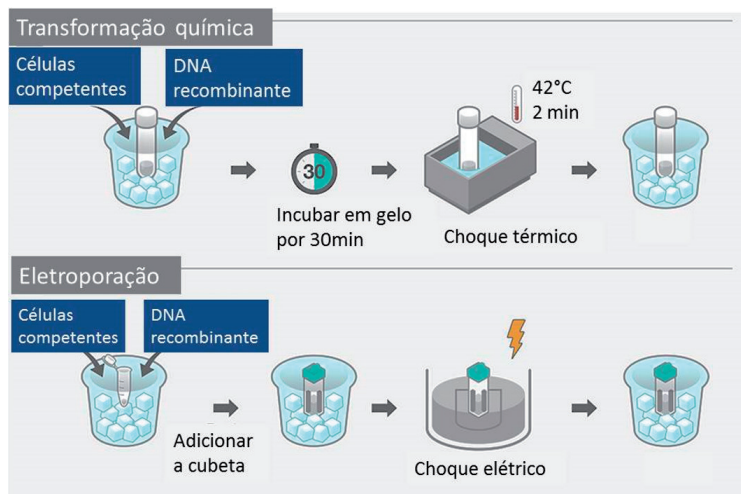
De igual modo, o descarte desse material também deve ser realizado de maneira segura e controlada, garantindo que os organismos geneticamente modificados (OMGs) não oferecerão nenhum risco às pessoas e/ou ao meio ambiente. Mesmo que as cepas engenheiradas da bactéria *E. coli* usadas nesses trabalhos não necessitem de um nível de biossegurança elevado, geralmente NB1, todo o cuidado deve ser tomado a fim de se evitar a contaminação não somente do sistema, mas também do ambiente externo.

Transformação

A transformação (Figura 9), de maneira simplificada, significa tornar a parede celular/membrana plasmática da bactéria “permeável” à entrada do plasmídeo recombinante. Os métodos mais utilizados para tal procedimento são o da transformação química ou eletroporação.

A transformação química é realizada usando-se células previamente convertidas em competentes¹⁵ em que se emprega um choque térmico breve. Na eletroporação, a bactéria é também preparada de forma específica, tornando-a competente, fazendo com que a membrana bacteriana se mostre mais permeável durante a passagem de um pulso elétrico breve e controlado. Existem equipamentos adequados, de custo relativo baixo, para a realização desse procedimento. Convém ressaltar que a eletroporação é mais rápida e origina um maior número de células transformadas comparativamente à transformação química, ou seja, amostras bem mais diluídas de DNA são ainda capazes de gerar células transformadas.

Figura 9 – Esquema do processo de transformação química e eletroporação



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

Após o procedimento de choque, seja térmico ou elétrico, deixa-se a bactéria crescer por cerca de 1 h em meio de cultura, e, em

¹⁵Chama-se célula competente a célula que foi previamente tratada com cloreto de cálcio (ou tratamento similar), que a tornou susceptível a incorporar um plasmídeo sob um choque térmico (ou, eventualmente, um choque elétrico).

seguida, realiza-se um plaqueamento da cultura em meio seletivo (com antibiótico) em placa de Petri, incubando-se por 15 a 18 h à temperatura de 37 °C. No dia seguinte, devem-se observar várias colônias na placa, as quais devem estar o mais isoladas quanto possível. A fim de melhorar a qualidade dessas colônias, é aconselhado que seja feito novo plaqueamento, tipo esfregão com uma colônia (*restrick*), dessa forma, minimiza-se a presença de qualquer célula de *E. coli* sem plasmídeo nas vizinhas imediatas. Convém mencionar que células pré-existentes de *E. coli* sem o plasmídeo não são eliminadas pelo antibiótico ampicilina, o mais usado nesses processos, mas suas células filhas sim, pois, durante a produção da parede celular, a ampicilina atuará bloqueando esse processo, mas não naquelas cujas paredes já existem.

Considerando que o clone (plasmídeo recombinante) foi preparado usando-se vetor do tipo pET resistente à ampicilina, com promotor T7 (regulado pelo indutor IPTG) e transformado em cepa BL21(DE3) de *E. coli*, devem-se realizar as etapas posteriores, descritas na sequência.

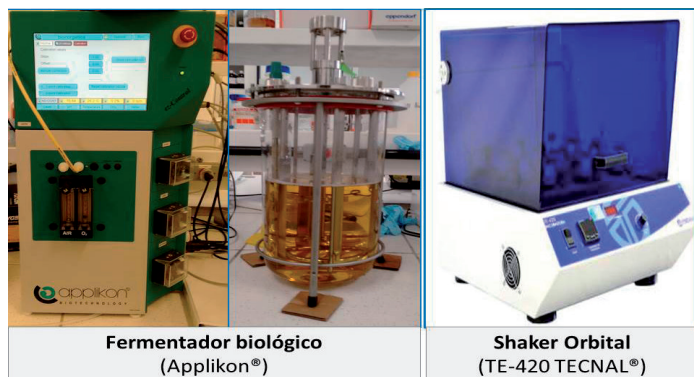
Inoculação

Após a obtenção da célula transformada em placa de Petri, inicia-se o processo de expressão com o preparo de um pré-inóculo, um pequeno crescimento em meio de cultura LB (Luria-Bertani Broth) em presença de antibiótico nas condições de agitação e temperatura de trabalho (por exemplo, 200 rpm e 37 °C), o qual será utilizado para produção em maior escala.

A realização da inoculação é bastante similar à do pré-inóculo, com diferença nas quantidades de material utilizado (usualmente 1/100 de volume de inóculo para novo meio de cultura), e depende do equipamento disponível para o crescimento bacteriano, se biorreator ou *shaker* orbital (Figura 10). É necessária, no mínimo, a manutenção da temperatura e da velocidade de rotação adequadas para o crescimento bacteriano, geralmente, utiliza-se 37 °C nessa etapa e rotação entre 200-225 rpm, para oxigenação e homogeneização do meio. Outro aspecto importante é a quantidade de meio de cultura e a dimensão do frasco Erlenmeyer usado no crescimento, não sendo recomendado usar volume

superior a 50% da capacidade do frasco; usar o correspondente a um quarto, 25% do volume total do frasco, para garantir uma máxima oxigenação, é ideal. Alternativamente ao uso de frascos em agitador orbital (*shaker*), existe a possibilidade de se empregar um reator/fermentador biológico, o qual permite controlar oxigenação, rotação, temperatura, pH do meio e taxa de alimentação, durante o decorrer de todo o processo de crescimento e expressão, proporcionando alcançar elevada densidade celular e altos níveis de proteína expressa.

Figura 10 – Exemplos de biorreator (fermentador), à esquerda, e agitador orbital (*shaker*), à direita



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

LB tipo Miller é o meio mais comumente utilizado para a cultura de cepas recombinantes de *E. coli*. Isso se deve à sua relativa facilidade de preparo e riqueza de nutrientes, composto por peptona (10 g), proteína semidigerida usada como fonte de carbono e nitrogênio; yeast (5 g), extrato de levedura que estimula o crescimento bacteriano; e cloreto de sódio (10 g) – concentração ótima para determinadas cepas, para 1 L de água destilada. Observação: a quantidade de cloreto de sódio é a metade (5 g) nas formulações Lennox. Entretanto, quando há problemas em se conseguir densidade celular adequada, pode-se optar pelo uso de outro meio de cultura que contenha maior quantidade de carboidrato e cátions divalentes.

Outro meio para crescimento bacteriano disponível é o TB (Terrific Broth), o qual contém concentrações aumentadas de peptona, extrato de levedura e utiliza glicerol como fonte de carbono.

Indução (Expressão da proteína de interesse)

Durante o crescimento celular, deve-se medir, com certa frequência, a densidade celular no meio, a fim de garantir uma densidade adequada no momento da indução. Na verdade, a densidade celular para indução é outra importante variável que deve ser levada em consideração para ótima produção de sua proteína. Deve-se lembrar que densidades celulares indicativas de se estar no meio da fase de crescimento exponencial são, em geral, uma situação propícia para expressão, visto que as células estão em sua melhor fase de crescimento e mostram-se em condições saudáveis para iniciar a produção de outras proteínas. Todavia, em certos casos, observam-se melhorias em condições mais tardias. Apesar disso, o crescimento excessivo deve ser evitado, o que pode levar à morte de muitas células e, ainda, reduzir a capacidade do maquinário celular para a expressão da proteína de interesse, além de, possivelmente, promover a degradação das proteínas. A densidade celular pode ser acompanhada por um espectrofotômetro (ou colorímetro) no comprimento de onda de 600 nm, por meio do espalhamento de luz provocado pelo crescimento celular que se reflete em uma medida aparente de absorvância. Apesar de não existir uma densidade celular ideal, a mais frequentemente usada encontra-se entre 0,6-0,7 unidade de absorção em 600 nm, consistente com o meio da fase exponencial de crescimento. O tempo de crescimento, anterior à indução, pode variar de acordo com a quantidade de inóculo usada (geralmente, recomenda-se usar 1/100 de inóculo, mas inóculos mais concentrados podem também ser usados), o meio de cultura empregado e a própria cepa utilizada, entre outras variáveis (por exemplo, agitação). Entretanto, em geral, espera-se entre 3 e 6 horas para alcançar uma densidade apropriada para indução.

A adição de indutor, sendo o mais comumente usado IPTG,¹⁶ dependendo da proteína a ser expressa, pode vir acompanhada de uma

¹⁶ IPTG é a molécula isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo, um análogo da alolactose, que se trata de um isômero da lactose. O IPTG, diferentemente da alolactose, não é hidrolizada pela β-galactosidase e funciona como indutor do *operon lac*.

redução na temperatura (por exemplo, 22 °C, 30 °C), mas cada caso deve ser investigado. Geralmente, a redução na temperatura é feita para expressão de proteínas maiores (> 60 kDa), com cofatores e com enovelamento mais complexo (multidomínios). O tempo para encerrar esse processo, após a indução, deve ser aquele em se obtenha a máxima expressão das proteínas em condições funcionais e com garantia da manutenção saudável das células. Caso contrário, a proteína pode inclusive ser degradada ainda nessa etapa de produção. Esse tempo é bastante variável (4 h, 7 h, 18 h ou até mais) e depende do sistema célula – proteína, tamanho da proteína, tipo de promotor usado, sendo assim, deve ser investigado para cada expressão a ser realizada.

A coleta das células

Após o tempo de indução, finaliza-se o processo de expressão com a coleta das células por centrifugação, para que a proteína seja posteriormente purificada. Recomenda-se manter as células sob gelo (ou em refrigerador) enquanto são totalmente centrifugadas sob refrigeração (4 ou 10 °C), cuja velocidade de rotação deve ser suficiente para a formação do *pellet* celular e apresentar sobrenadante límpido. Devem-se evitar velocidades muito elevadas, que podem, eventualmente, danificar as células. Geralmente, rotações na faixa de 5000-7000 rpm são usadas. A partir desse momento, não é mais necessária a manipulação em ambiente estéril, visto que a contaminação microbiana não é mais um risco para sua produção. Entretanto, convém lembrar que boas condições de higiene devem ser mantidas.

Assim, ao final da centrifugação, o sobrenadante é descartado, enquanto o *pellet* das células é separado, sendo imediatamente iniciadas as etapas de purificação ou congelamento rápido para armazenagem em *ultrafreezer* (~ -80 °C), para a proteína ser posteriormente purificada. A purificação da proteína de interesse pode seguir diversas rotas, muito dependente da sua natureza, mas devendo-se empregar etapas de separação cromatográfica, seja usando resinas de afinidade, no caso de proteína contendo cauda de histidina, e/ou resina de troca iônica, bem como filtração em gel, comumente usada em etapas finais. Por

exemplo, na purificação da heme proteína DevS (SOUSA *et al.*, 2007; LOBAO *et al.*, 2019), que apresenta tamanho moderado (62 kDa), com vários domínios proteicos e ponto isoelétrico em 4,9, utiliza-se a seguinte sequência de etapas: rompimento das células, precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografias usando inicialmente uma coluna hidrofóbica (fenil sepharose), seguida por coluna de troca aniônica [resina DEAE (dietilaminoetil) – sepharose], sendo, eventualmente, necessária uma limpeza final de refinamento usando coluna de exclusão por tamanho (resina S200, por exemplo).

Estratégias e potenciais problemas

Nas últimas décadas, um número expressivo de estratégias foi desenvolvido para contornar problemas com a expressão e a purificação de proteínas. A seguir, mencionamos alguns casos relevantes.

Proteínas tóxicas e com códons raros

Algumas proteínas recombinantes podem ser tóxicas para a célula do hospedeiro, o que requer cuidados adicionais, visto que a sua expressão certamente será prejudicada se não for bem planejada. O uso de uma condição que garanta a plena supressão da expressão se torna mais relevante, por vezes, o uso de glicose adicional no meio de cultura, para evitar qualquer pequena expressão precoce. Isso se torna relevante quando se usam promotores moderados ou fortes (*T7*, *tac*), que tendem a iniciar o processo de expressão da proteína, ainda que em pouca quantidade, antes da adição de indutor. Isso pode levar a prejudicar todo o maquinário celular devido à situação de estresse. O uso de cepas como a BL21(DE3) pLyss (Sigma-Aldrich) é uma estratégia adequada para minimizar essa situação, caso sejam usados vetores do tipo pET (promotor T7). Nesse caso, a cepa já dispõe de um plasmídeo que produz baixos níveis da lisozima T7, que é um inibidor natural da T7 polimerase, responsável pela expressão em sistema sob controle do promotor T7. Dessa forma, na condição não induzida, tem-se uma redução da presença de T7 polimerase, minimizando qualquer produção

não induzida da proteína tóxica. Outros plasmídeos com promotores mais fortemente controlados, como o regulado por arabinose P_{BAD} , têm sido recomendados, bem como outras cepas de *E. coli* capazes de tolerar maiores estresses (C43(DE3)pLysS, por exemplo).

É possível ainda que a proteína de interesse possua códons raros (códigos para a produção de aminoácidos) que a *E. coli* não consegue traduzir de maneira eficiente, e isso pode ocasionar uma baixa expressão, ou mesmo estrutura primária incorreta, com a produção apenas de partes da proteína. Para esses casos, podem-se adquirir cepas especiais como a Rosetta(DE3)pLysS, uma derivação da BL21 que pode ser obtida comercialmente (Sigma-Aldrich), a qual, além de decodificar códons raros, ainda inibe a enzima T7 polimerase, impedindo a expressão precoce da proteína.

Proteína expressa em corpos de inclusão (não solúvel)

A proteína pode ter alta massa molecular (longa cadeia de aminoácidos), possuir multidomínios e/ou conter segmentos muito hidrofóbicos e com alta complexidade, ou ainda apresentar pontes dissulfeto em sua estrutura. Todos e cada um desses fatores individualmente podem gerar proteínas expressas na forma insolúvel, o que torna sua purificação problemática, necessitando tratamentos de desnaturação e renaturação. Essas etapas podem levar ao isolamento da proteína, mas esta, geralmente, encontra-se funcionalmente danificada. Entre as estratégias disponíveis, o abaixamento da temperatura durante a indução tem sido amplamente usado para ajudar no processo de expressão e enovelamento da proteína; bem como outras condições de expressão mais brandas, inclusive o uso de promotor moderado, como *tac*, além do uso de cepas de *E. coli* específicas. Todavia, outras rotas podem ainda ser necessárias para se obter a proteína solúvel, tal como usar um plasmídeo que contenha uma proteína fundida (*fusion tag*), como MBP (*maltose binding protein* ou proteína de ligação à maltose, tamanho de 42 kDa), que funciona melhorando tanto a solubilidade quanto servindo para purificação por afinidade. Uma alternativa é o uso do plasmídeo pET SUMO, que funde uma proteína bem menor à sua proteína de interesse, SUMO (11 kDa).

Essa proteína é um modificador relacionado à ubiquitina, mas que está envolvida na estabilização e localização de proteínas *in vivo*.

Similarmente às proteínas fundidas descritas anteriormente, a *tag* Trx, de tiorredoxina, funciona como proteína pequena que também ajuda a tornar proteínas fundidas mais solúveis, além de outras previamente discutidas. Alguns plasmídeos têm a opção de se adicionar a tiorredoxina na porção N-terminal enquanto uma *his-tag* é adicionada na porção C-terminal, tornando possível incrementar a solubilidade e usar coluna de afinidade para purificação, simultaneamente. Geralmente, nas versões comerciais de *tag*, tem-se a opção de remoção por tratamento com proteases específicas.

Outra *tag* bastante usada é a cauda de histidina, ou *his₆-tag* (também disponível com maior número sequencial de histidinas), que, apesar de não melhorar a solubilidade da proteína, é bastante usada por facilitar o processo de purificação usando coluna de afinidade contendo níquel ou cobalto. A incorporação dessa *tag* torna possível o isolamento rápido e com grande eficiência da sua proteína de interesse, sendo necessária, em vários casos, apenas uma etapa cromatográfica. O uso dessa *tag* torna possível, inclusive, recuperar eficientemente proteínas insolúveis em corpos de inclusão, tratando-se a amostra com desnaturante químico, forçando sua solubilização. Posteriormente, a remoção do desnaturante possibilita a renaturação da proteína. Apesar disso, é comum, nesse tipo de procedimento, obter-se a proteína pura sem atividade biológica. Outro cuidado que se deve ter é quando se emprega essa estratégia para heme proteínas, por exemplo, uma vez que o imidazol, usado para eluição dessa coluna de afinidade, é também um ligante do grupo heme. Assim, um largo excesso e longo tempo de contato com a heme proteína podem ser problemáticos, levando inclusive à sua precipitação.

Existem vários tipos de *tags* utilizadas para facilitar esses e outros processos. Lembrando que essas sequências já estão presentes no plasmídeo quando seu gene é inserido, de forma a fundi-las à sua proteína de interesse. Dessa forma, devem-se seguir os protocolos anteriormente descritos para clonagem, atentando-se para os sítios de restrição a serem usados, informados pelas empresas que os comercializam, caso se deseje fundir com certas *tags*.

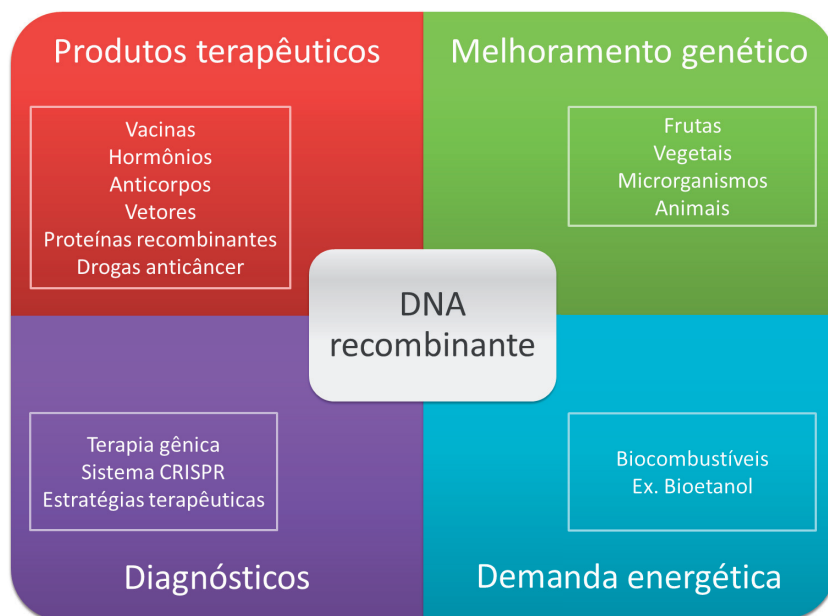
Considerações adicionais sobre a otimização da produção da proteína recombinante

Após selecionados os elementos básicos, plasmídeo e cepa, deve-se ainda realizar a otimização de expressão da proteína, o que é dependente de várias condições de cultivo, tais como temperatura, agitação, densidade celular para indução, concentração do indutor, tempo de indução, meio de cultura. Recomenda-se que seja feito um estudo dessas variáveis em pequena escala, assim evitando o gasto desnecessário de material e tempo. Essas condições são essenciais para obtenção de máxima produção da proteína, bem como da qualidade da proteína recombinante expressa, que deve ser levada em consideração. O sucesso de sua expressão não depende somente da escolha de um plasmídeo supostamente adequado ou da cepa mais apropriada, mas, fundamentalmente, das condições em que essa bactéria crescerá e como e quando produzirá sua proteína. A densidade celular para indução é um tópico, que previamente discutimos, que leva às variáveis de temperaturas de indução, tempo, concentração do indutor. A agitação, apesar de importante, é uma variável menos explorada que as anteriores, mas não menos relevante.

Exemplos de aplicações biotecnológicas

No início do século passado, a tecnologia do DNA recombinante não passava de aspirações da comunidade científica. Na era atual, entretanto, essa área do conhecimento tem se mostrado cada vez mais presente nos produtos e processos, muitos deles de direto impacto na qualidade de vida das pessoas. Temos à nossa disposição a produção de proteínas essenciais para a resolução de problemas de saúde, o aumento dos recursos alimentares, novas formas de proteger, melhorar e facilitar a agricultura, diversos usos e descobertas na indústria farmacêutica e outras numerosas aplicações biotecnológicas que vêm confirmando a importância, relevância e o poder do conhecimento desenvolvido em torno da tecnologia do DNA recombinante (KHAN *et al.*, 2016) (Figura 11).

Figura 11 – Alguns exemplos de aplicações da tecnologia do DNA recombinante



Fonte: elaborada pelos autores do capítulo.

As técnicas de DNA recombinante, além da produção de proteínas, também podem ser usadas para aumentar a produção de compostos de baixo peso molecular, como vitaminas, aminoácidos, corantes, precursores de biopolímeros e, inclusive, antibióticos. Nesses casos, o micro-organismo hospedeiro é projetado para se tornar uma fábrica para a produção de metabólitos úteis.

Entre as proteínas recombinantes preparadas para fins comerciais, seja na indústria, em medicina ou agricultura, as enzimas¹⁷ se destacam na maior parte desses segmentos. Um exemplo é a enzima lipase, produzida pelo micro-organismo *Pseudomonas alcaligenes*,

¹⁷Enzimas são, geralmente, proteínas capazes de catalisar reações complexas (acelerar a sua velocidade) com alto rendimento, sendo, ainda, altamente específicas ao substrato.

que é uma proteína capaz de remover mais eficientemente manchas de “gordura” em tecidos. Porém, esse micro-organismo a produz em baixa escala, e, mesmo quando inserida em outros hospedeiros, o processo de sua produção se mostrava pouco viável. Uma das alternativas foi alterar o tipo de plasmídeo empregado nessa produção, o que resultou em um aumento considerável da produção dessas lipases. Além disso, a modificação de outros parâmetros de expressão, como a diminuição dos níveis de CO₂ no fermentador, levou a expressivas melhoras, viabilizando o processo. Esses trabalhos são excelentes casos de otimizações e estudos de melhoramento da expressão de uma proteína de interesse industrial, um caminho longo, mas que levou ao sucesso em fornecer lipase com qualidade e quantidade suficientes para uso em sabão em pó. Todavia, a busca por lipases mais robustas, eficientes e baratas ainda é uma área de pesquisa bastante ativa.

O interesse nesse tipo de catalisador se faz cada vez mais presente, em virtude de se tratar de biomolécula, facilmente biodegradável na natureza, sendo considerado seu uso um segmento da Química verde. Além desse caso particular, outros podem ser citados envolvendo diversos segmentos comerciais, como brevemente descrevemos a seguir.

A produção do leite do tipo coalho ocorre devido à ação de uma enzima chamada quimosina. Tradicionalmente, o agente de coagulação do leite para a produção de queijo era derivado do estômago de bezerras e consistia em uma mistura de substâncias que coletivamente é chamada de coalho. Para produzir quantidades maiores de queijo com baixo custo, utiliza-se, desde os anos 90, a quimosina recombinante.

Anteriormente ao desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, a maioria dos produtos farmacêuticos de origem proteica, particularmente derivadas de humanos, estava disponível em quantidades bastante limitadas. A razão para isso era que sua produção era extremamente cara, e, em vários casos, o modo de ação dessas proteínas também não estava bem caracterizado. Contudo, após o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, foi possível produzir várias proteínas humanas a partir de suas sequências de pares de base, algumas usadas como biofármacos. Além disso, há outras milhares delas que estão sob estudo no mundo, cujas funções biológicas e possíveis papéis farmacológicos vêm

sendo elucidados. A maioria das proteínas humanas investigadas tem sido expressa em células hospedeiras de mamíferos e bactérias, havendo centenas delas submetidas a testes clínicos com seres humanos para o tratamento de várias doenças.

As aplicações da produção de proteínas recombinantes na indústria farmacêutica são diversas. Podemos citar a produção da insulina, a produção de hormônio do crescimento, de vacinas – como a do antígeno da hepatite B – e ainda em diagnóstico, como a identificação do anticorpo do HIV por uma proteína recombinante. Recentemente, uma animadora descoberta poderá potencializar o uso de duas proteínas recombinantes para converter o sangue tipo A em sangue tipo O, doador universal (RAHFELD *et al.*, 2019). Duas enzimas do *Flavonifractor plautii*, expressas em *E. coli*, mostraram-se eficientes na remoção da *N*-acetil-galactosamina (GalNac), numa reação sequencial, da superfície de células sanguíneas. O sangue tipo A apresenta GalNac na superfície da célula, enquanto o sangue tipo O não, sendo exatamente isso que o torna compatível como doador universal. Dessa forma, é possível que, num futuro breve, possamos ampliar a capacidade de uso do sangue doado com esse tratamento.

Diagnósticos

A etapa inicial e imprescindível para o tratamento de qualquer doença é o seu correto diagnóstico, em especial quando se trata de uma infecção causada por micro-organismos como vírus, fungos ou bactérias. Em geral, qualquer estratégia de detecção útil deve ser específica, sensível e simples. Infelizmente, muitos desses procedimentos de detecção envolvem o crescimento de uma cultura do potencial patógeno e, em seguida, a análise de várias propriedades fisiológicas que facilitam sua identificação.

Embora testes desse tipo sejam eficazes e razoavelmente específicos, eles são, frequentemente, lentos e caros. Para superar essa grande restrição, procedimentos de diagnóstico molecular usando metodologias imunológicas ou de detecção de DNA foram desenvolvidos, como, por exemplo, o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ensaio

de imunoabsorção enzimática), além de sistemas bioluminescentes, sistemas de hibridização de ácidos nucleicos, entre outros. O emprego da tecnologia do DNA recombinante vem tornando possível prepararmos anticorpos e proteínas de patógenos como antígenos.

Conclusão

O uso de biomoléculas possui uma infinidade de aplicações no mundo presente e projeta um futuro promissor. Os benefícios dos maquinários biológicos de micro-organismos, cada vez mais, têm sido compreendidos para muito além do uso farmacêutico, sendo possível a aplicação inclusive na produção de biocombustíveis. Um exemplo rápido é o incremento na produção de hidrogênio por meio de cianobactérias. Vale ressaltar que, na questão energética, além das melhorias no aproveitamento dos insumos, busca-se ainda a formação de subprodutos com menor carga poluidora em relação aos combustíveis usados em larga escala atualmente. Percebe-se, então, que o campo da biotecnologia que reúne as técnicas de biologia molecular associadas à engenharia genética e DNA recombinante cresce com rapidez e abre espaço para descobertas que hoje ainda não se vislumbram. A pesquisa científica nesse ramo é, sobretudo, uma ação estratégica na resolução dos problemas da humanidade, presentes e vindouros.

Referências

ALMHJELL, P. J.; MILLS, J. H. Metal-chelating non-canonical amino acids in metalloprotein engineering and design. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 51, p. 170-176, 2018.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciencia, 2008.

COHEN, S. N. *et al.* Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, 1973.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 5, p. Unit 5.24.1-29, 2010.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. *GST Gene Fusion System Handbook*. General Electric Company, 2002-2014.

GLICK, B. R.; PASTERNAK, J. J. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1998.

GLICK, B. R.; PASTERNAK, J. J.; PATTEN, C. L. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2010.

KHAN, S. *et al.* Role of recombinant DNA technology to improve life. *International Journal of Genomics*, 2405954, 2016.

LEHNINGER, A. L. *Bioquímica: replicação, transcrição e tradução da informação genética*. São Paulo: Edgard Blucher, 1977. v. 4.

LIU, C. C.; SCHULTZ, P. G. Adding new chemistries to the genetic code. *Annual Review of Biochemistry*, v. 79, p. 413-44, 2010.

LOBAO, J. *et al.* Oxygen triggers signal transduction in the DevS (DosS) sensor of mycobacterium tuberculosis by modulating the quaternary structure. *Febs J*, v. 286, n. 3, p. 479-494, 2019.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos: Revista Científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, Goiânia*, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

NOVAGEN. *pET System Manual*. TB055, 10th edition, Rev.B 0403. EMD Biosciences, 2003.

RAHFELD, P. *et al.* An enzymatic pathway in the human gut microbiome that converts A to universal O type blood Article. *Nature Microbiology*, v. 4, p. 1475-1485, 2019.

ROGER, S. D. Biosimilars: current status and future directions. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 10, n. 7, p. 1011-1018, 2010.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 172, 2014.

SOUSA, E. H. S. *et al.* DosT and DevS are oxygen-switched kinases in mycobacterium tuberculosis. *Protein Science: a publication of the Protein Society*, v. 16, n. 8, p. 1708-1719, 2007.

SUTCH, B. T. *et al.* Integrated teaching of structure-based drug design and biopharmaceutics: a computer-based approach. *Journal of Chemical Education*, v. 89, n. 1, p. 45-51, 2012.

A INTERDISCIPLINARIDADE DA QUÍMICA DE MICRO-ORGANISMOS: dos genes ao metabolismo secundário

Luciana da Silva Amaral e Taicia Pacheco Fill

Introdução

O interesse do homem por produtos naturais remonta à própria história. As civilizações antigas da Mesopotâmia, Grécia e China utilizavam extratos botânicos no tratamento de doenças (JI; LI; ZHANG, 2009; SOLECKI, 1975). Já o emprego de produtos naturais de origem microbiana é mais recente, sendo este marcado pela descoberta da penicilina em 1929 por Alexander Fleming (FLEMING, 1929). Esse marco estimulou a descoberta de uma infinidade de produtos naturais bacterianos, incluindo a tetraciclina isolada de *Streptomyces erythraea*, a vancomicina produzida por *Amycolatopsis orientalis* e a rifamicina produzida por *Streptomyces mediterranei* (BAKER; CHU; OZA, 2007). Desse modo, o século XX foi marcado pelo estudo sistemático de isolamento e identificação de produtos naturais com interesse em suas propriedades biológicas e correspondente emprego nas áreas farmacológica e agrícola (CRAGG; NEWMAN, 2005; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Nos últimos 25 anos, o estudo da química de produtos naturais vem passando por profundas transformações em decorrência do grande

avanço tecnológico que resultou em equipamentos poderosos para separação e identificação desses compostos, aliado aos métodos genéticos e de biologia molecular, permitindo, dessa forma, mergulhar em um novo universo do conhecimento das vias biossintéticas.

Desenvolvimento da hipótese biossintética e o emprego de precursores isotopicamente marcados

A biossíntese de produtos naturais (PNs) microbianos sempre despertou grande interesse da comunidade científica. A compreensão das vias metabólicas e dos precursores biossintéticos envolvidos na formação dos complexos metabólitos secundários intrigam até hoje os cientistas, e pesquisas envolvendo o estudo da biossíntese de PNs continuam sendo realizadas em todo o mundo.

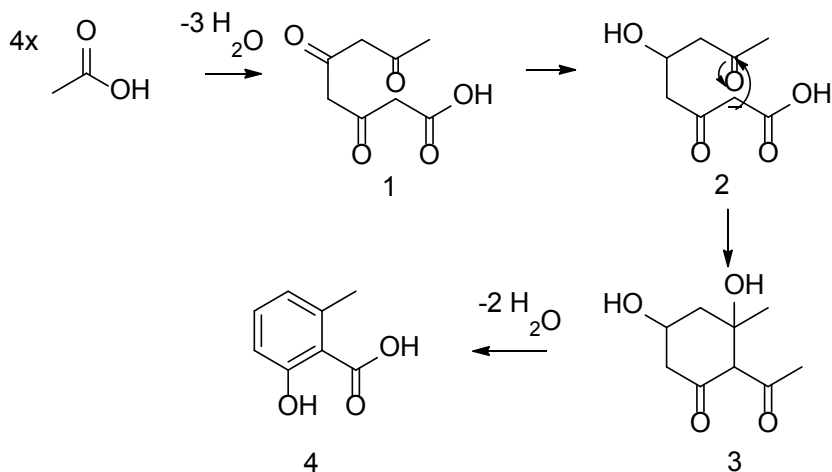
O conhecimento desses precursores biossintéticos e dos mecanismos envolvidos nas etapas enzimáticas da biossíntese de PNs pode contribuir para o melhoramento de processos biotecnológicos, assim como poderia concorrer para a otimização da produção *in vitro* de um determinado metabólito secundário alvo pela otimização das condições de fermentação. A biossíntese pode ainda ser explorada, para a síntese química *in vitro* ou *in vivo*, a partir da utilização de métodos de biologia molecular em células de organismos-modelo, como *Escherichia coli*, combinando substratos com enzimas recombinantes.

A longa e bem-sucedida história de experimentos com precursores isotopicamente marcados na pesquisa de produtos naturais abriu as portas para uma maior compreensão das vias metabólicas de muitos compostos importantes. Os primeiros experimentos envolvendo a utilização de precursores isotopicamente marcados foram realizados pelos pesquisadores Schoenheimer e Rittenberg em 1935. Os pesquisadores utilizaram ácidos graxos e esteróis deuterados no sentido de determinar a rota metabólica desses compostos em um organismo vivo (SCHOENHEIMER; RITTENBERG, 1935).

Ainda nesse sentido, a utilização de precursores isotopicamente marcados possibilitou o primeiro estudo da biossíntese de um policeetídeo, o ácido 6-metil-salicílico (6-MSA), por Birch nos anos 1950s

(BIRCH; MASSY-WESTROPP; MOYE, 1955). O ácido 6-metil-salicílico é um policetídeo aromático produzido pelo fungo *Penicillium patulum* e é um intermediário na biossíntese da toxina patulina (SHOOLINGIN-JORDAN; CAMPUZANO, 1999). Birch, baseando-se na estrutura química do ácido 6-metil-salicílico (6-MSA) (4), propôs que esse metabólito é biossintetizado a partir de quatro unidades de acetato que se organizavam no sentido cabeça-cauda (*head to tail*) para gerar o intermediário 1 (Figura 1). Ainda de acordo com sua hipótese, Birch propunha que uma carbonila é reduzida a um grupo hidroxila (Figura 1, intermediário 2), e, posteriormente, haveria uma condensação aldólica para formar um anel de 6 membros (BIRCH; MASSY-WESTROPP; MOYE, 1955). Finalmente, Birch propunha uma sequência de reações de desidratação e enolizações levando ao produto aromático final.

Figura 1 – Proposta de Birch para a origem biossintética do ácido 6-metil-salicílico



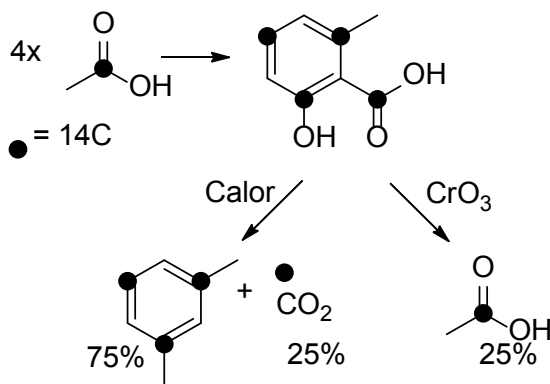
Ácido 6-metil-salicílico

Fonte: elaborada pelas autoras.

Para confirmar toda sua proposta biossintética, Birch utilizou o precursor acetato isotopicamente marcado com ^{14}C no C-1 (BIRCH; MASSY-WESTROPP; MOYE, 1955).

De acordo com sua hipótese, quatro posições no produto ácido 6-metil-salicílico (6-MSA) deveriam incorporar radioatividade (Figura 2). A análise das posições enriquecidas com o isótopo era realizada de maneira extensa e cuidadosa a partir de estudos de degradação química. Após esses estudos, os pesquisadores provaram em laboratório, pela primeira vez, a biossíntese do 6-MSA, e os resultados foram consistentes com o padrão de incorporação previsto por Birch (Figura 2).

Figura 2 – Estudos de degradação química do composto 6-MSA realizados por Birch, para verificação da radioatividade nos produtos



Fonte: elaborada pelas autoras.

O elegante trabalho de Birch com precursores biossintéticos inaugurou um período de intensa atividade na comunidade de produtos naturais e do uso de precursores isotopicamente marcados para estudar a biossíntese desses metabólitos secundários. Com o desenvolvimento de técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM), o uso de núcleos radioativos, como ${}^{14}\text{C}$ e ${}^3\text{H}$, foi alterado para a utilização de isótopos estáveis, como ${}^{13}\text{C}$ e ${}^2\text{H}$ (SIMPSON, 2014), e, como consequência, o uso dos métodos de degradação química na área de química de produtos naturais está quase extinto, e os novos métodos sintéticos e analíticos para a detecção de isótopos passaram por uma grande evolução, permitindo hoje aplicações ilimitadas na pesquisa envolvendo biossíntese.

O uso de isótopos não é de todo antiquado e continua a fornecer informações muito importantes sobre as vias metabólicas de produtos naturais microbianos. Há uma série de excelentes revisões sobre o assunto, por exemplo (RINKEL; DICKSCHAT, 2015), o que torna desnecessário entrar em muitos detalhes aqui.

Apesar de todo o avanço nas técnicas genéticas e de toda a visão de biossíntese que temos hoje, a utilização de precursores isotopicamente marcados ainda contribui significativamente para a área. Existem exemplos recentes na literatura nos quais esses experimentos foram essenciais para determinação da correta compreensão da biossíntese. O entendimento dos mecanismos biossintéticos da fitotoxina rizoxina, por exemplo (BRETSCHEIDER *et al.*, 2013), um potente agente anti-mitótico que se liga à β -tubulina da bactéria *Burkholderia rhizoxinica* (SCHERLACH *et al.*, 2006), foi apenas possível a partir da administração de precursores isotopicamente marcados.

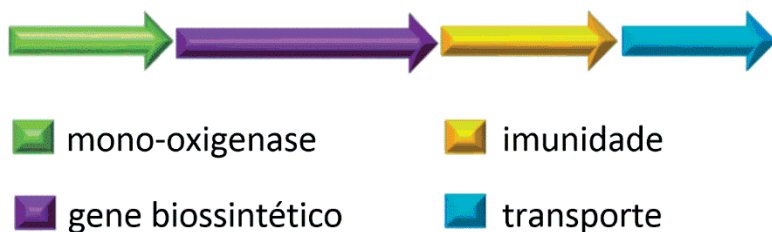
Estudos biossintéticos e a abordagem genética

No início dos anos 2000, sequenciamentos de genomas de actinobactérias e fungos filamentosos revelaram que esses organismos possuem vasto potencial para produção de metabólitos secundários. Uma das descobertas mais notáveis e inesperadas do sequenciamento dos genomas de micro-organismos foi a constatação de que eles contêm muito mais agrupamentos de genes para a biossíntese de metabólitos secundários do que havia sido previsto a partir do número de metabólitos previamente isolados (BENTLEY *et al.*, 2002; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; ŌMURA, *et al.*, 2001). *Streptomyces coelicolor* A3(2) foi o primeiro micro-organismo a ter seu genoma sequenciado, e as informações contidas no genoma forneceram evidências da elevada capacidade para a produção de metabólitos secundários, embora muitos dos metabólitos secundários codificados não sejam expressos sob condições de cultivo padrão. Assim, o genoma de *Streptomyces coelicolor* revelou mais de vinte agrupamentos de genes responsáveis pela biossíntese de produtos naturais, enquanto menos de seis metabólitos eram conhecidos (BENTLEY *et al.*, 2002). As informações de anotação do

genoma concederam aportes para predizer os elementos estruturais relacionados a um dado metabólito e elucidar seu maquinário biossintético. Por esse estudo, foi possível estabelecer como os genes biossintéticos responsáveis pelas diversas etapas envolvidas na produção de um produto natural estão organizados (BENTLEY *et al.*, 2002; CHALLIS, 2014; CHALLIS; HOPWOOD, 2003; PAWLIK *et al.*, 2007).

Os genes responsáveis pela biossíntese de produtos naturais microbianos, em geral, encontram-se como agrupamentos lineares junto a genes que são responsáveis por modificações estruturais (mono-oxigenases, glicosil transferases), genes transcricionais, de transporte e imunidade. A esse agrupamento de genes que codifica a biossíntese de um metabólito secundário é dado o nome de gênico biossintético (HOFFMEISTER; KELLER, 2007; OSBOURNE, 2010). Recentemente, tornou-se aparente que genes responsáveis pela via biossintética de diferentes metabólitos de plantas também estão organizados em *clusters* gênicos (OSBOURN; FIELD, 2009; SWAMINATHAN *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2016). A Figura 3 ilustra um *cluster* gênico biossintético hipotético.

Figura 3 – Representação esquemática de um *cluster* gênico biossintético hipotético



Fonte: elaborada pelas autoras.

À medida que avançamos para o século XX, testemunhamos um grande avanço nas técnicas genéticas, e, com o advento dos sequenciadores de nova geração, inúmeros genomas de micro-organismos foram sequenciados, e os dados, depositados em bancos de dados genômicos. Essas ferramentas avançadas de biologia molecular abriram novamente

espaço para a compressão das vias biossintéticas de PNs sob uma nova e importante perspectiva, agora olhando detalhadamente para a função dos genes e fornecendo compreensão dos mecanismos enzimáticos.

Portanto, assim como a introdução aos isótopos abriu as portas para a elucidação das vias biossintéticas na década de 1950, o desenvolvimento de técnicas genéticas na década de 1980 abriu o caminho para a descoberta das enzimas biossintéticas (STAUNTON; WEISSMAN, 2001). O principal pioneiro nessa área foi David Hopwood, que estudou a biossíntese do policetídeo actinorhodina, uma molécula com coloração azul (MALPARTIDA; HOPWOOD, 1984). Por meio de uma série de mutações genéticas aleatórias no organismo parental, os pesquisadores conseguiram isolar um micro-organismo mutante que deixou de apresentar fenótipo com coloração azul, o que indicou que a mutação genética ocorreu no *cluster* biossintético desse metabólito. Posteriormente, por uma série de experimentos cuidadosamente planejados ao longo de vários anos, os genes que codificam as enzimas da biossíntese da actinorhodina foram identificados, e a sequência primária das várias proteínas foi estabelecida. A próxima etapa foi atribuir funções às enzimas por comparação com a sequência de proteínas já conhecidas na época. Vários componentes mostraram homologia com as diversas enzimas das ácidos graxos sintases, e, assim, os domínios na biossíntese de policetídeos puderam ter seu papel de extensão da cadeia propriamente atribuídos (STAUNTON; WEISSMAN, 2001). Inúmeras pesquisas vieram em seguida para estabelecer o funcionamento modular das enzimas policetídeos sintases (PKSs).

A partir dos dados genômicos e análises *in silico*, verificou-se que as vias biossintéticas de PNs contêm geralmente *backbone enzymes*, isto é, policetídeo sintase (PKS), peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) ou dimetilalil transferase (DMAT), para geração do esqueleto de carbono do metabólito secundário. Dentro dos *clusters* biossintéticos, também existem genes que codificam para vários outros tipos de enzimas que realizam modificações pós-traducionais dos produtos intermediários, por exemplo, hidroxilase, O-metiltransferase e citocromo P450 (WALSH; TANG, 2017).

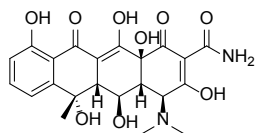
Com base nessas características comuns dos *clusters* de genes biossintéticos de PNs, muitas ferramentas de bioinformática têm sido

desenvolvidas e amplamente utilizadas para caracterizar a base genética de suas respectivas biossínteses, como SMURF (KHALDI *et al.*, 2010) e antiSMASH (MEDEMA *et al.*, 2011), que são complementares às abordagens químicas e genéticas e provaram ser muito úteis para desvendar as vias de biossíntese de novos compostos. Essas ferramentas de bioinformática possibilitaram a rápida anotação e identificação de *clusters* de genes biossintéticos de metabólitos secundários em genomas bacterianos e fúngicos, pois se integram com um grande número de abordagens de análise de metabólitos secundários *in silico* que foram publicadas anteriormente e possibilitam a comparação com *clusters* gênicos biossintéticos já descritos na literatura. A visualização de todos os possíveis *clusters* gênicos biossintéticos possibilitou o surgimento de uma nova abordagem para a descoberta de produtos naturais, a mineração do genoma ou *genome mining*, que tem possibilitado a geração de diversidade estrutural em produtos naturais (WARD; ALLENBY, 2018).

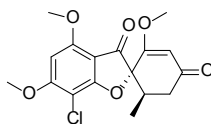
Policetídeo sintase

Policetídeos são produzidos por diferentes organismos, desde os mais simples, como protistas e bactérias, até os mais complexos, como fungos e plantas (HERTWECK, 2009; KATSUYAMA; OHNISHI, 2012; O'HAGAN, 1995; RAWLINGS, 1999; SHEN, 2003; STAUNTON; WEISSMAN, 2001; STAUNTON; WILKINSON, 1997; YU *et al.*, 2012). Policetídeos representam uma classe extraordinariamente diversa de produtos naturais, os quais possuem intrigantes esqueletos carbônicos como polifenóis, macrolídeos, polienos e poliéteres (CHAN *et al.*, 2009; HERTWECK, 2009; SHEN, 2003; STAUNTON; WEISSMAN, 2001; YU *et al.*, 2012). Como consequência da grande complexidade estrutural aliada a atividades biológicas relevantes, muitos policetídeos são utilizados na medicina como antibióticos, antifúngicos, redutores de colesterol, imunossuppressores, antitumorais e antiparasitários (ENDO, 1992; STAUNTON; WEISSMAN, 2001; VEZINA; KUDELSKI; SEHGAL, 1975; WEISSMAN, 2016; YOU; KHOSLA; CANE, 2013). A Figura 4 ilustra exemplos de estruturas químicas de policetídeos notórios na medicina.

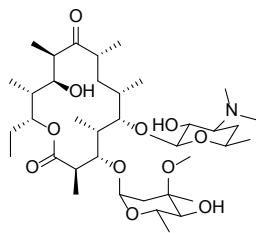
Figura 4 – Estruturas químicas de policetídeos com relevantes atividades biológicas



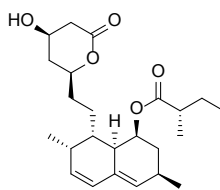
Oxitetraciclina



Griseofulvina



Estreptomicina A



Lovastatina

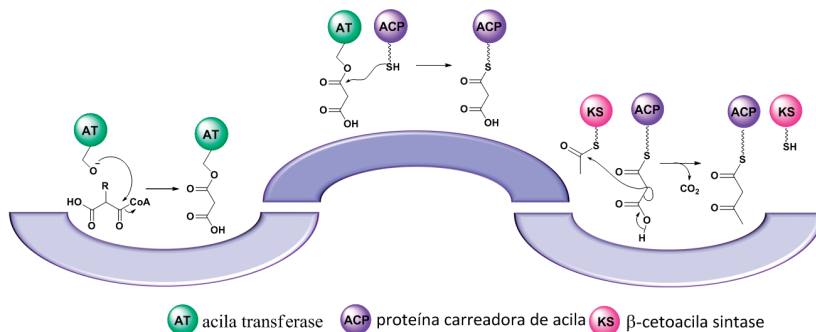
Fonte: elaborada pelas autoras.

A cadeia carbônica dos policetídeos é biossintetizada a partir de repetidas descarboxilações via condensações de Claisen de unidades acila com malonil-CoA ou outros precursores pela PKS. As PKSs são enzimas multifuncionais compostas por vários domínios com diferentes atividades catalíticas. Os domínios são agrupados em unidades de trabalho denominadas módulos, sendo cada módulo responsável pela introdução de um bloco construtor na cadeia carbônica crescente, inserção de uma modificação química estrutural e, em seguida, transporte do intermediário para o domínio subsequente (HERTWECK, 2009; PIEL, 2010; SHEN, 2003; STAUNTON; WEISSMAN, 2001; WEISSMAN, 2016).

Todas as PKSs possuem, no mínimo, os domínios β -cetoacila sintase (KS), acila transferase (AT) e o domínio proteína carreadora de acila (ACP). O domínio acila transferase (AT) seleciona e carrega a unidade extensora, geralmente o malonil-CoA, através da reação com a serina em seu sítio ativo. Após a reação, a unidade extensora é transferida ao grupo tiol da proteína carreadora de acila. A β -cetoacila sintase (KS) catalisa a incorporação do precursor, geralmente a acetila, via condensação de Claisen, de modo semelhante a uma linha de montagem (HERTWECK, 2009; PIEL, 2010; SHEN, 2003; STAUNTON;

WEISSMAN, 2001; WEISSMAN, 2016). A Figura 5 apresenta os passos catalíticos de extensão da cadeia carbônica pela PKS.

Figura 5 – Linha de montagem representando os passos catalíticos de extensão da cadeia policetídic, evidenciando os domínios enzimáticos e respectivas reações na síntese de policetídeos



Fonte: elaborada pelas autoras.

AT: acil transferase; ACP: proteína carreadora de acila; KS: cetoacil sintase.

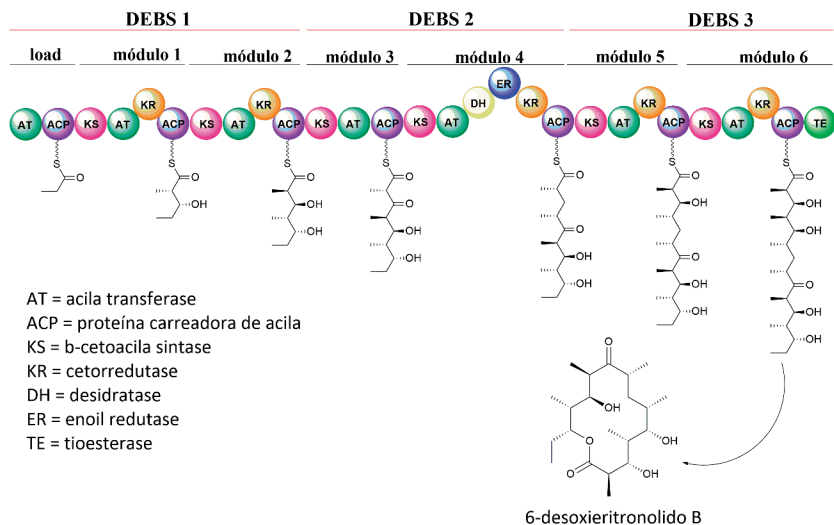
A diversidade estrutural dos policetídeos decorre em grande parte da inclusão de domínios funcionais nas PKSs. Após cada ciclo de extensão da cadeia carbônica, funcionalizações na posição β podem ser promovidas pela β -ceto-reduzase (KR), desidratase (DH) e enoil-redutase (ER). Os domínios KRs reduzem as faces *Re* ou *Si* das funções β -ceto nascentes inserindo grupos hidroxila e podem controlar a estereoquímica de centros adjacentes à metila na posição α via epimerização (HERTWECK, 2009; KEATINGE-CLAY, 2007; PIEL, 2010; SHEN, 2003; STAUNTON; WEISSMAN, 2001; WEISSMAN, 2016; YOU; KHOSLA; CANE, 2013). Os domínios DHs conduzem a eliminação de água para gerar porções olefinicas que exibem configurações *cis* ou *trans*, enquanto os domínios ERs reduzem as ligações duplas levando a intermediários saturados, sendo, novamente, possíveis dois resultados estereoquímicos. Há ainda a possibilidade da existência de outros domínios como metil transferase (MT), metil esterase (ME), tioesterase (TE), entre outros (ALHAMAD SHEH *et al.*, 2007; HERTWECK, 2009; KEATINGE-CLAY, 2007; PIEL, 2010; SHEN, 2003; STAUNTON; WEISSMAN, 2001; WEISSMAN, 2016; WU *et al.*, 2005; YOU; KHOSLA; CANE, 2013).

As PKSs são classificadas em três categorias: PKS tipo I, PKS tipo II e PKS tipo III. Estas podem ser também divididas em iterativas e modulares não iterativas, dependendo de cada domínio catalisar ou não mais de um ciclo de extensão da cadeia carbônica (CHAN *et al.*, 2009; HERTWECK, 2009; KUSHNIR *et al.*, 2012; MUSIOL; WEBER, 2012; OLANO *et al.*, 2010; SHEN, 2003; STAUNTON; WEISSMAN, 2001; YOU; KHOSLA; CANE, 2013).

As PKSs do tipo I possuem os domínios catalíticos arranjados linearmente e ligados covalentemente, podem ser modulares não iterativas e iterativas, em geral, quando presentes em sistemas bacterianos ou fúngicos, respectivamente.

Um exemplo clássico de PKS do tipo I modular não iterativa é aquele envolvido na biossíntese do precursor da eritromicina, a enzima denominada 6-desoxieritronolido sintase (DEBS). Conforme pode ser observado na Figura 6, a DEBS é uma megasintase multimodular dividida em três grandes proteínas DEBS 1, DEBS 2, DEBS 3, constituída por seis módulos de extensão, precedidos pelo módulo de carregamento/iniciação, nos quais os domínios estão organizados. A linha de montagem dessa PKS utiliza sete precursores, constituída por um propionil-CoA como unidade iniciadora e seis (2S)-metilmalonil-CoA como unidades extensoras da cadeia policetídica (CAFFREY *et al.*, 1992; CORTES *et al.*, 1990; MALPARTIDA; HOPWOOD, 1984; STANZAK *et al.*, 1986; TUAN *et al.*, 1990; WEBER; LOSICK, 1988). Observando-se a Figura 6, nota-se que cada módulo possui os três domínios necessários para catalisar um ciclo de extensão da cadeia; β -cetoacila sintase (KS), aciltransferase (AT) e proteína carreadora de acila (ACP), assim como um conjunto variável de domínios (KR, DH e ER) associados à modificação do grupo ceto (BEVITT *et al.*, 1992; DONADIO *et al.*, 1991). Nessa representação, o conjunto de domínios inicia-se com o domínio β -cetoacila sintase (KS) e termina com uma proteína carreadora de acila (ACP). Na porção inicial da DEBS 1, há a presença dos domínios AT e ACP, os quais aceitam a unidade iniciadora propionato a partir do propionil-CoA, enquanto na DEBS 3, após o término do módulo 6, nota-se a presença de uma tioesterase (TE), a qual catalisará a liberação do policetídeo nascente e promoverá a ciclização, levando ao 6-desoxieritronolido B (CAFFREY *et al.*, 1992; CORTES *et al.*, 1990; STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

Figura 6 – Organização dos domínios da eritromicina policetídeo sintase



Fonte: adaptada de Staunton e Weissman (2001).

Os domínios putativos estão representados como círculos. Cada módulo é constituído pelos domínios essenciais KS, AT e ACP.

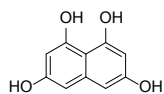
No caso da biossíntese do 6-desoxieritronolido B, a quantidade de módulos correlaciona-se com cada ciclo de extensão da cadeia, e a presença dos domínios KR, DH e ER define o grau de processamento na posição β . Além disso, cada módulo opera na ordem em que estão dispostos, e o produto formado apresenta os grupos funcionais nos carbonos alternados, iniciando-se a partir da primeira unidade extensora: hidróxi, hidróxi, ceto, metileno, hidróxi, hidróxi e um grupo acila, respectivamente. Essa correspondência entre os módulos da PKS e a estrutura química do produto formado é denominada como princípio da colinearidade, que se torna a base para a compreensão do modo de ação das PKSs modulares, sendo de grande utilidade na reprogramação da PKS para biossíntese de novos metabólitos via manipulação genética e também para prever a estrutura da enzima (STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

As PKSs do tipo I iterativa são comuns em fungos e, dependendo da presença ou ausência dos domínios KR, DH e ER, são classificadas como altamente reduzidas (HR), parcialmente reduzidas (PR) e não reduzidas (NR). Os policetídeos altamente reduzidos possuem os

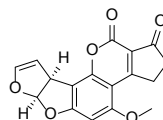
domínios KR, DH e ER, os quais são responsáveis pela redução total do grupo β -ceto, catalisando as conversões do grupo ceto ao grupo hidroxila, com posterior desidratação, levando o grupo hidróxi ao grupo enoil e, por fim, a redução do grupo enoil ao grupo alquila. As PKSs parcialmente reduzidas possuem os domínios KR e DH, enquanto que, nas não reduzidas, os domínios KR, DH e ER são ausentes (COX, 2007; STAUNTON; WEISSMAN, 2001). A Figura 7 apresenta exemplos de estruturas químicas das diferentes classes de policetídeos fúngicos.

Figura 7 – Estruturas químicas de policetídeos fúngicos não reduzidos, parcialmente reduzidos e altamente reduzidos

Policetídeos não reduzidos

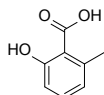


Tetraidroxi naftaleno

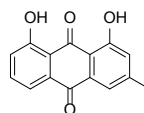


Aflotoxina B1

Policetídeos parcialmente reduzidos

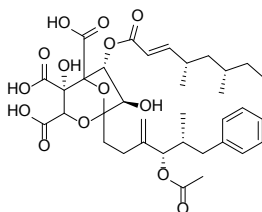


Ácido 6-metil salicílico

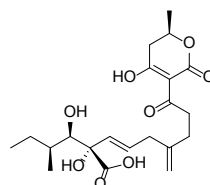


Benzofenona

Policetídeos altamente reduzidos



Esqualestatina S1



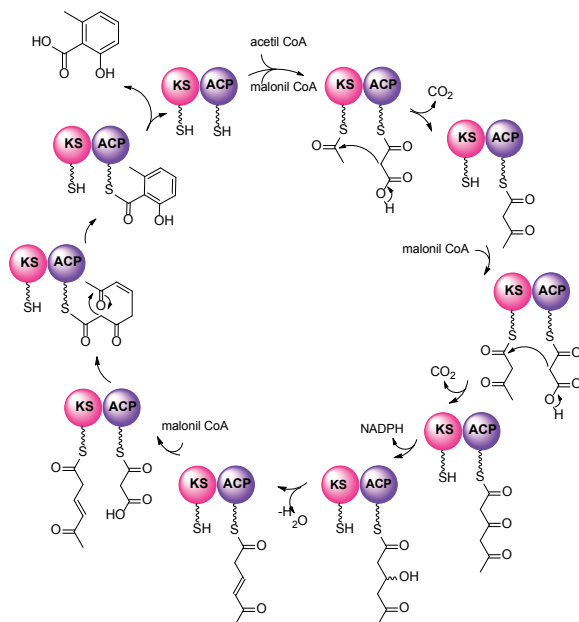
Ácido alternárico

Fonte: elaborada pelas autoras.

A PKS tipo I iterativa está envolvida na biossíntese do ácido 6-metil salicílico, o qual é produzido a partir de um acetato como unidade iniciadora e por três malonatos como unidades extensoras. A enzima responsável pela biossíntese desse produto natural fúngico é o ácido 6-metil salicílico sintase (6-MSAS), o qual é composto pelos domínios KS, MAT,

DH, KR e ACP. Nesse caso, o domínio MAT é o responsável por transportar o malonil-CoA. Nesse módulo, ocorrem três ciclos de extensão da cadeia policetílica, levando a diferentes níveis de redução em cada estágio. As duas primeiras condensações ocorrem uma na sequência da outra, no entanto, após a segunda condensação, há uma redução, seguida de desidratação. Posteriormente, ocorre um novo ciclo de extensão da cadeia carbônica pela condensação da terceira unidade de malonil-CoA. Após o terceiro ciclo, a cadeia policetílica sofre ciclização, desidratação e enolização, levando ao policetídeo aromático, como pode ser observado na Figura 8 (SHOOLINGIN-JORDAN; CAMPUZANO, 1999).

Figura 8 – Via biossintética do policetídeo ácido 6-metil salicílico



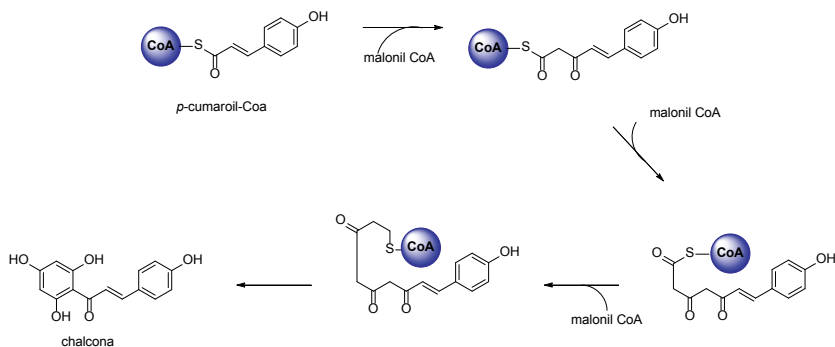
Fonte: adaptada de Staunton e Weissman (2001).

Os produtos característicos da PKS do tipo II são compostos aromáticos fenólicos produzidos exclusivamente por bactérias. As reações biossintéticas envolvem a condensação das unidades construtoras para produzir a cadeia policetílica e subsequente ciclização e aromatização (STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

Nas plantas, as PKSs são do tipo III, também denominadas de chalcona/estilbeno sintase. As chalconas sintases (CHSs) produzem uma série de metabólitos (fenilpropanoides), os quais propiciam proteção à radiação ultravioleta, defesa contra patógenos e interação com micro-organismos (SCHRÖDER, 1999).

A síntese da chalcona pela CHS envolve a condensação da unidade iniciadora *p*-coumaroil-CoA com três unidades extensoras, geralmente malonil-CoA. O intermediário é, posteriormente, ciclizado via condensação de Claisen em um anel aromático hidroxilado, como pode ser observado na Figura 9 (FERRER *et al.*, 1999).

Figura 9 – Reações biossintéticas da chalcona sintase



Fonte: adaptada de Staunton e Weissman (2001).

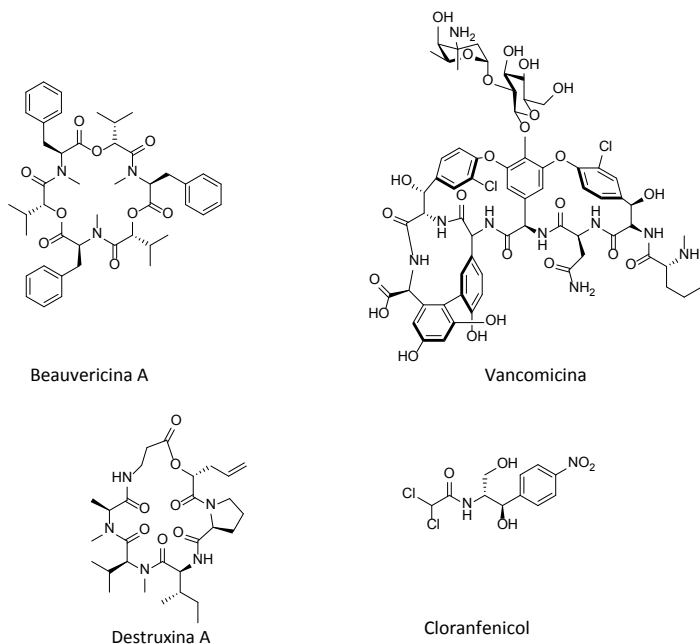
Peptídeo não ribossomal sintetase (NRPS)

Peptídeos e depsipeptídeos não ribossomais são biossintetizados pela peptídeo não ribossomal sintetase – NRPS (SÜSSMUTH; MAINZ, 2017; WEBER *et al.*, 1994). Assim como as PKSs, as NRPSs são megasenzimas constituídas por módulos, e estes módulos apresentam domínios responsáveis pela ativação do bloco construtor e posterior reação entre os blocos construtores ativados (WALSH, 2004; WEBER *et al.*, 1994; WEISSMAN, 2015).

Produtos naturais derivados de NRPSs são biossintetizados, majoritariamente, por bactérias e fungos (SÜSSMUTH; MAINZ, 2017). Peptídeos e depsipeptídeos produzidos via NRPS apresentam ampla diversidade estrutural, a qual, em geral, é responsável por pronunciadas

atividades biológicas (BLOUDOFF; SCHMEING, 2017; SÜSSMUTH; MAINZ, 2017). Na Figura 10, observam-se exemplos de estruturas químicas importantes dessa classe de compostos, vancomicina e cloranfenicol de uso terapêutico comercial, destruxina A e beauvericina A, inseticidas naturais produzidos pelos ascomicetos *Metarhizium anisopliae* e *Bauveria bassiana*, respectivamente (SÜSSMUTH; MAINZ, 2017).

Figura 10 – Estruturas químicas de peptídeos e depsipeptídeos não ribossomais

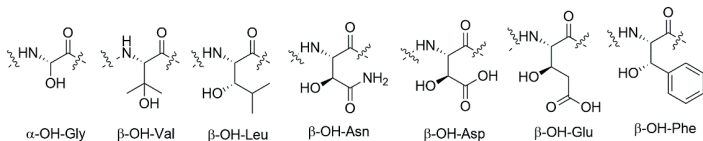


Fonte: elaborada pelas autoras.

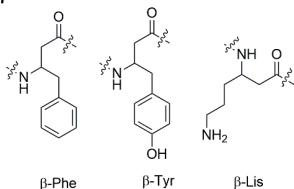
NRPSs são enzimas flexíveis e não se limitam aos vinte aminoácidos proteínogênicos. Dessa forma, empregam hidroxiaminoácidos, β -aminoácidos, fenilglicinas, aminoácidos com cadeia lateral contendo N, ácidos aminobenzoicos, metilaminoácidos, homoaminoácidos, α -hidroxíácidos, além de outros como precursores (MEIER; BURKART, 2009; WENZEL *et al.*, 2005; WENZEL *et al.*, 2006; MOOTZ; SCHWARZER; MARAHIEL, 2002; DU; LOU, 2010). A Figura 11 apresenta exemplos desses precursores.

Figura 11 – Estruturas químicas de aminoácidos não proteogênicos que ocorrem em NRPSs

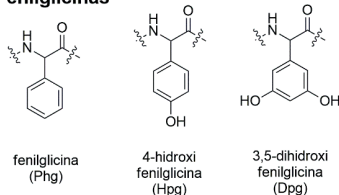
Hidroxi aminoácidos



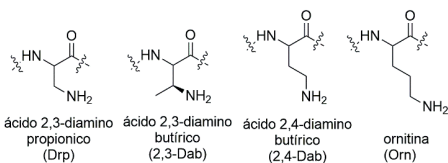
β -aminoácidos



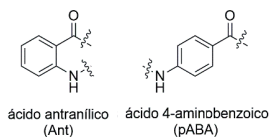
Fenilglicinas



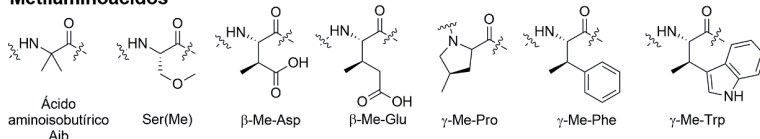
Aminoácidos com cadeia lateral contendo N



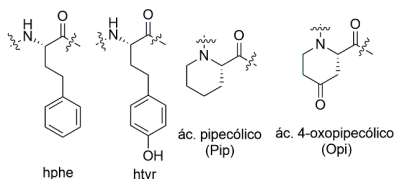
Ácidos aminobenzoicos



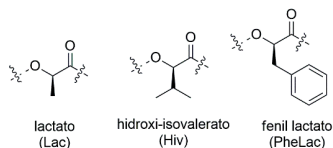
Metilaminoácidos



Homoaminoácidos



α -hidroxiácidos

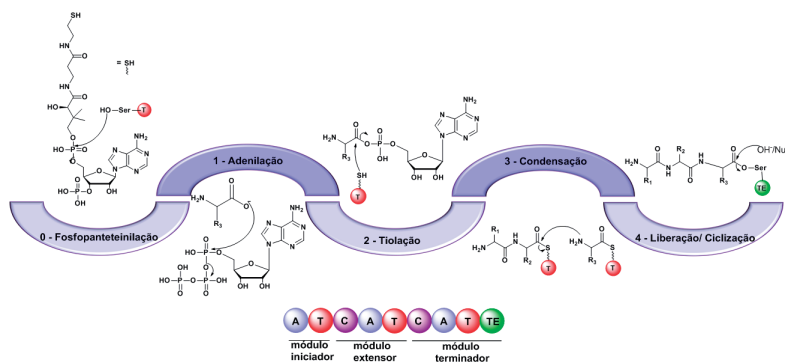


Fonte: elaborada pelas autoras.

Assim como as PKSs, as NRPSs são enzimas modulares que funcionam como uma linha de montagem na qual cada módulo é responsável pela incorporação de um bloco construtor. Os módulos podem ser subdivididos em iniciador e extensor. O módulo iniciador é constituído dos domínios de adenilação (A) e tiolação (T ou PCP). O módulo de extensão

é constituído pelos domínios mencionados e pelo domínio de condensação. O domínio de adenilação é responsável pela seleção do precursor que compõe o produto e, portanto, controla sua sequência primária. O domínio de adenilação ativa o aminoácido (ou derivado) consumindo ATP, e um amino acila-AMP é formado. O domínio de tiolação funciona como uma unidade de transporte que aceita o aminoácido ativado, como um tioéster, pela ação do cofator 4' fosfopanteteína. Esse cofator é transferido pós-translacionalmente a um resíduo de serina no domínio T ou PCP e atua como um braço flexível para que o amino acila e o substrato peptídica viajem entre os diferentes sítios catalíticos. Já o domínio de condensação é responsável pela formação da ligação peptídica. Nesse domínio, ocorre o ataque nucleofílico do grupo amina (imina ou hidróxi) na posição *downstream* ao grupo acila ligado na posição *upstream*. O domínio de condensação possui sítios específicos para o nucleófilo e o eletrófilo (SÜSSMUTH *et al.*, 2011). A Figura 12 representa esquematicamente a tradução da informação gênica, mostrando os módulos, a subdivisão desses, bem como os domínios e a atividade catalítica desempenhada por eles.

Figura 12 – Organização dos domínios de NRPSs e suas respectivas reações



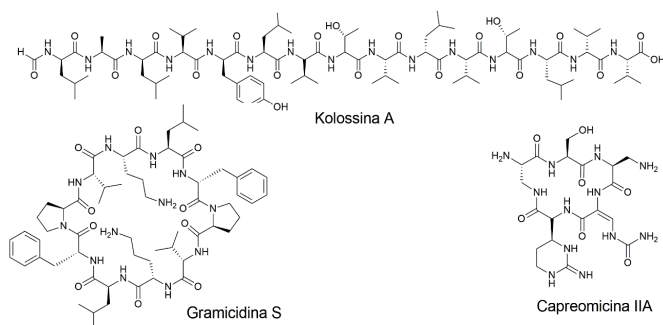
Fonte: adaptada de Süßmuth *et al.* (2011).

(0) Entrega de Ppant mediada por PPTase em uma serina conservada do domínio apo-T; (1) A seleção e adenilação do aminoácido pelo domínio A gera um aminoácido-AMP e PPI; (2) A tiolação subsequente do aminoácido ativado e a liberação de AMP produzem um tioéster aminoacila ligado ao Ppant do domínio holo-T; (3) Formação da ligação peptídica pelo domínio C, o qual acopla o aminoácido ativado ao aminoácido ou ao peptídeo nascente que está ligado ao módulo *upstream*; (4) A liberação do oligopeptídeo pela formação de uma ligação éster intermediária entre o terminal C do peptídeo e uma serina conservada do domínio Te. A hidrólise ou ataque intramolecular de uma porção nucleofílica produz um produto linear ou macrocíclico, respectivamente. Nuc = nucleófilo.

A biossíntese de peptídeos não ribossomais é um processo altamente controlado, dessa forma, a ativação e a incorporação de precursores são ordenadas por cada módulo, e o término da biossíntese é catalisado pelo domínio tioesterase (TE) presente no último módulo. A liberação do produto é conduzida por um intermediário acila-O-TE, que pode sofrer um ataque nucleofílico levando peptídeo linear ou macrociclo. NRPSs também podem apresentar em seu sítio ativo domínios para modificação de precursores ou intermediários para modificação destes por *N*-metilação (M), oxidação/redução (Ox/KR), epimerização (E), formação de heterociclos (Cy). A presença desses domínios nos módulos de extensão permite gerar modificações no produto, levando diversidade estrutural (SÜSSMUTH; MAINZ, 2017).

Do mesmo que as PKSs, as NRPSs podem ser classificadas em três tipos. As NRPSs tipo A lineares são enzimas que funcionam como uma linha de montagem, pois o número de módulos é igual ao número de precursores incorporados. Em NRPSs do tipo B iterativas, os múltiplos módulos são reutilizados em diversos ciclos de extensão da cadeia polipeptídica. Em geral, o mecanismo iterativo leva a produtos simétricos. Uma variação do mecanismo iterativo é o modo não linear, caracterizando NRPSs do tipo C, em que um domínio, e não um módulo inteiro, é utilizado mais de uma vez durante a biossíntese do peptídeo não ribossomal (SÜSSMUTH *et al.*, 2011). A Figura 13 evidencia exemplos de NRP oriundos dos três tipos de NRPSs.

Figura 13 – Estruturas químicas da kolossina A, gramicidina S e capreomicina IIA biossintetizados por NRPSs do tipo A, B e C, respectivamente

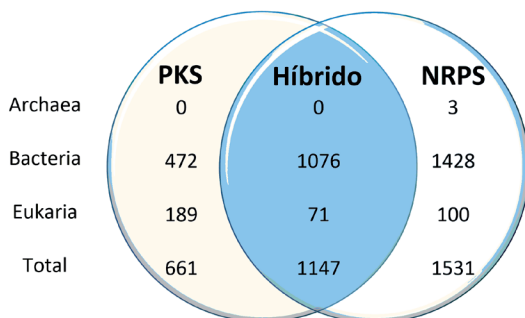


Fonte: elaborada pelas autoras.

Os sequenciamentos genéticos, a genômica comparativa, estudos bioquímicos, biologia molecular e o avanço na bioinformática, além de permitirem a identificação dos *clusters* gênicos mencionados, possibilitaram identificar sistemas híbridos, policetídeo sintase-peptídeo não ribossomal sintetase (PKS-NRPS) e peptídeo não ribossomal sintetase-policetídeo sintase (NRPS-PKS), os quais são responsáveis pela biossíntese de inúmeros produtos naturais. Os estudos de *genome mining* ou, literalmente, mineração do genoma de 2.699 organismos pertencentes aos três domínios (Archaea, Bacteria e Eukarya) encontraram que, aproximadamente, um terço dos 3.339 *clusters* gênicos identificados corresponde a *clusters* híbridos, os quais são distribuídos de forma heterogênea nos três domínios, conforme pode ser observado na Figura 14 (WANG *et al.*, 2014).

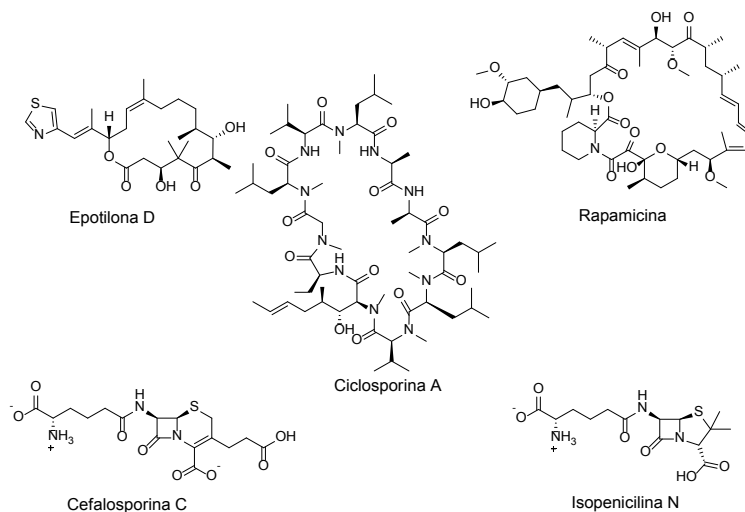
As PKS-NRPS e NRPS-PKS são capazes de se comunicar e, coletivamente, orquestrar a biossíntese de estruturas químicas altamente complexas. Ambas as enzimas são semelhantes no que concerne aos módulos compostos por domínios, e a similaridade das proteínas carreadoras permite a conexão entre a PKS e a NRPS e vice-versa (RICHTER *et al.*, 2008; WEISSMAN, 2015). Exemplos de metabólitos secundários híbridos são epotilona D, ciclosporina A, rapamicina, cefalosporina C e isopenicilina N, conforme pode ser visto na Figura 15.

Figura 14 – Diagrama de Venn dos *clusters* gênicos biossintéticos PKS, NRPS e híbridos PKS-NRPS/NRPS-PKS distribuídos nos domínios Archaea, Bacteria e Eukaria obtidos por mineração do genoma



Fonte: adaptado de Wang *et al.* (2014).

Figura 15 – Estruturas químicas dos metabólitos secundários epotilona D, ciclosporina A, rapamicina, cefalosporina C e isopenicilina N de origem biossintética híbrida PKS-NRPS



Fonte: elaborada pelas autoras.

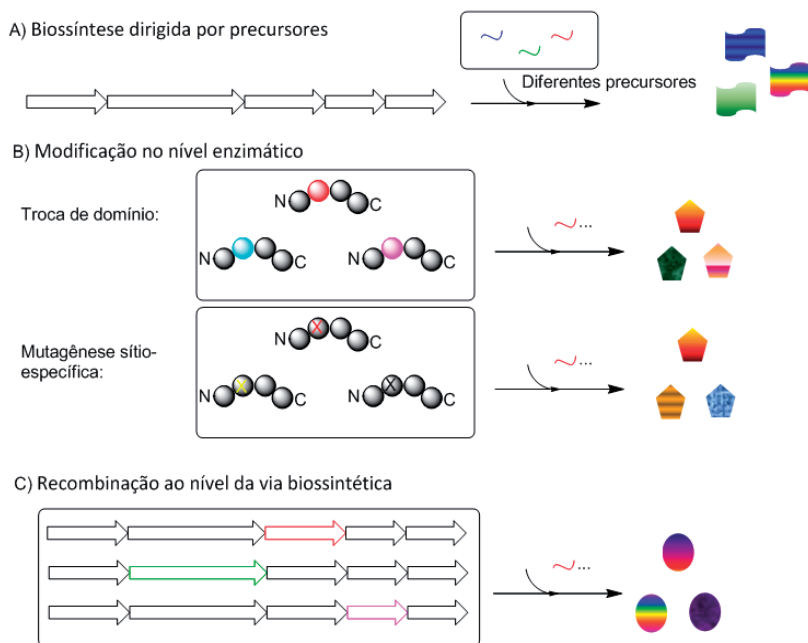
Biossíntese combinatória

O grande conhecimento relacionado à biossíntese de PN, decorrente da era genômica e do crescente sequenciamento de genomas microbianos, elevou as pesquisas em biossíntese a uma nova esfera de conhecimento. A partir desses estudos, iniciou-se a possibilidade de realização de manipulações nas vias biossintéticas desses produtos naturais em uma nova metodologia, introduzida na literatura como biossíntese combinatória.

A grande complexidade estrutural dos produtos naturais, muitas vezes, dificulta a produção de análogos com atividades biológicas aprimoradas com relação ao PN original. Em contraste, a biossíntese combinatória explora a promiscuidade do substrato e emprega enzimas e vias de engenharia para produzir novos produtos “não naturais”, o que expande, substancialmente, a diversidade estrutural de produtos naturais com potencial valor farmacêutico (SUN *et al.*, 2015). Inúmeras metodologias são descritas para a realização de biossíntese combinatória, entre elas: 1) biossíntese dirigida por precursores; 2) modificação a nível enzimático incluindo troca de domínios, módulos e subunidades, mutagênese sítio-específica e

evolução dirigida; 3) recombinação ao nível da via metabólica (Figura 16) (SUN *et al.*, 2015). As metodologias 1 e 2 serão abordadas aqui.

Figura 16 – Estratégias de biossíntese combinatória

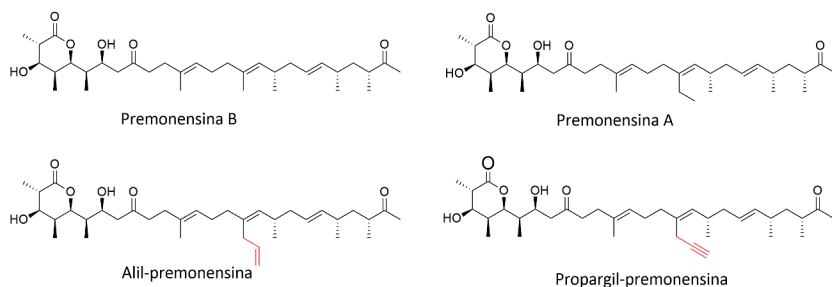


Fonte: Sun *et al.* (2015).

Uma das maneiras de obter diversidade estrutural de PN utilizando a biossíntese combinatória é a modificação dos precursores biossintéticos. A biossíntese combinatória dirigida pelos precursores aproveita a promiscuidade do substrato das enzimas nas vias biossintéticas para incorporar blocos de construção não nativos, produzindo, conseqüentemente, possíveis diferentes análogos de produtos naturais. Existem alguns exemplos muito bem-sucedidos dessa estratégia na literatura, que foram capazes de induzir diversidade estrutural de PN. Um exemplo interessante é o caso do antibiótico poliéter monensina produzido pelo micro-organismo *Streptomyces cinnamonensis* (BRAVO-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). O ionóforo poliéster monensina e

os derivados premonensina A e B são biossintetizados por uma PKS pela incorporação de etil ou metil-malonil-CoA no seu quinto módulo biossintético, respectivamente. O domínio aciltransferase (AT) no quinto módulo da monensina PKS mostrou incorporar derivados de ácido malônico “não naturais” como blocos de construção para produzir novos análogos de premonensina, como alil-premonensina e propargil-premonensina, conforme observados na Figura 17 abaixo, e, conseqüentemente, diversidade estrutural de PN policetí-dicos (BRAVO-RODRIGUEZ *et al.*, 2014).

Figura 17 – Estruturas químicas dos produtos naturais premonensina A e B e os derivados não naturais alil-premonensina e propargil-premonensina obtidos a partir de biossíntese combinatória

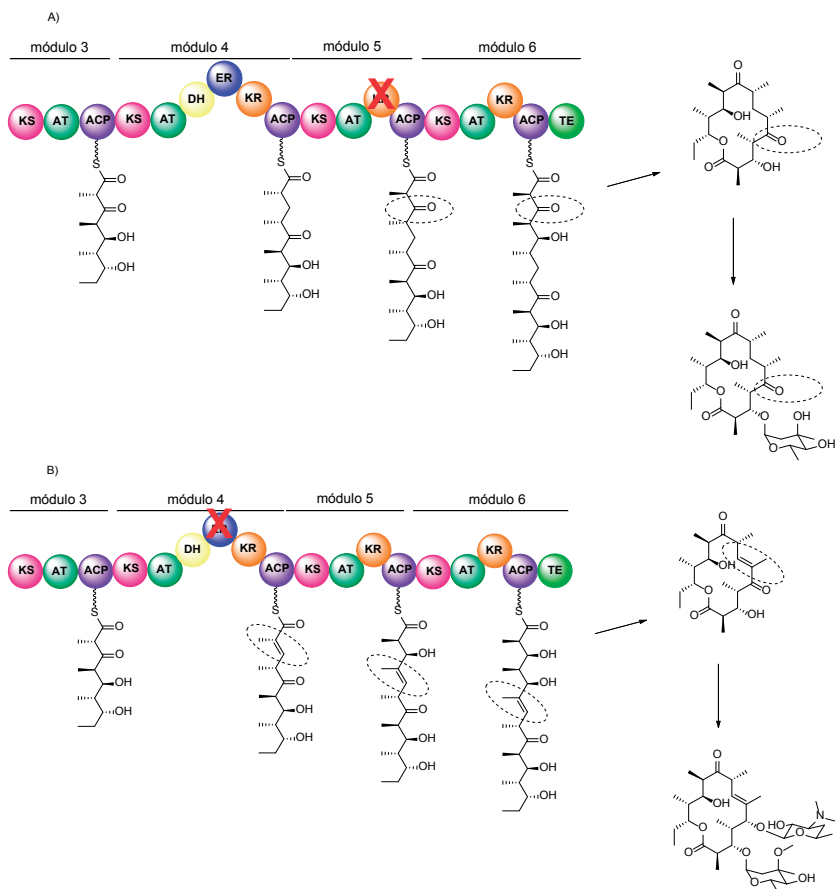


Fonte: elaborada pelas autoras.

A troca de domínios, módulos ou subunidades inteiras tem sido a principal abordagem clássica para a biossíntese combinatória. As PKSs e NRPSs são passíveis de biossíntese combinatória devido à sua organização modular. Leonard Katz e colaboradores foram os primeiros que realizaram experimentos pioneiros de deleções gênicas. Em 1991, os pesquisadores desativaram o domínio cetorreductase KR do módulo 5 do *cluster* biossintético da eritromicina, removendo assim uma parte do gene alvo responsável pela redução da carbonila e correspondente formação do grupo hidroxila (Figura 18A) (DONADIO *et al.*, 1991). Análises do micro-organismo mutante produziram dois análogos de eritromicina em que o grupo carbonila apresentava-se

na posição esperada, ou seja, não aconteceu a redução e consequente formação do grupo hidroxila conforme observado na biossíntese original desse policetídeo (DONADIO *et al.*, 1991). Subsequentemente, os mesmos pesquisadores inativaram o domínio enoil redutase ER no módulo 4, introduzindo mutações no local previsto de ligação com NADPH (DONADIO *et al.*, 1993). O mutante resultante produziu pequenas quantidades de um análogo de eritromicina incorporando uma dupla ligação na posição esperada (Figura 18B).

Figura 18 – Estratégias de biossíntese combinatória



Fonte: adaptada de Staunton e Weissman (2001).

Os outros aspectos da biossíntese combinatória podem ser revistos nas seguintes referências: Sun, Liu e Zhao (2015) e Floss (2006).

Considerações finais

Os produtos naturais têm sido a maior fonte de potenciais fármacos e micromoléculas de interesse humano, e esses compostos mudaram completamente o curso da história da medicina, biologia e da química, aumentando a expectativa de vida humana e auxiliando na qualidade do nosso dia a dia. Dessa forma, os produtos naturais microbianos representam um enorme recurso de estruturas químicas singulares, e as interações ambientais às quais os micro-organismos são submetidos na natureza têm sido consideradas a principal força propulsora para essa impressionante diversidade química.

Apesar do grande arsenal de micromoléculas já reportadas, os cientistas ainda têm muito a aprender com a natureza, e inúmeras novas estruturas químicas têm sido isoladas e avaliadas com relação ao seu potencial biológico todos os dias. O rápido desenvolvimento de tecnologias de biologia molecular e ferramentas genéticas têm tornado possível o acesso aos produtos naturais codificados no genoma de micro-organismos que não são expressos em condições de cultivo laboratoriais, permitindo, a partir de estudos de biologia molecular e estudos genéticos, a descoberta de novos e variados produtos naturais, assim como a manipulação das vias biossintéticas visando à diversidade estrutural. Dessa maneira, os estudos relacionados à compreensão da biossíntese de metabólitos secundários abrem portas para a próxima geração de químicos de produtos naturais e para a descoberta de novos esqueletos carbônicos e novas atividades biológicas que poderiam impactar diretamente no nosso cotidiano.

Referências

ALHAMADSHEH, M. M. *et al.* Modular polyketide synthases and cis double bond formation: establishment of activated cis-3-cyclohexylpropenoic acid as the diketide intermediate in phoslactomycin biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 7, p. 1910-1911, 2007.

BAKER, D. D. *et al.* The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.

BENTLEY, S. D. *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, v. 417, n. 6885, p. 141, 2002.

BEVITT, D. J. *et al.* 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*: cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. *European Journal of Biochemistry*, v. 204, n. 1, p. 39-49, 1992.

BIRCH, A. J.; MASSY-WESTROPP, R. A.; MOYE, C. J. Studies in relation to biosynthesis. VII. 2-Hydroxy-6-methylbenzoic acid in *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Australian Journal of Chemistry*, v. 8, n. 4, p. 539-544, 1955.

BLOUDOFF, K.; SCHMEING, T. M. Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1865, n. 11, p. 1587-1604, 2017.

BRAVO-RODRIGUEZ, K. *et al.* Predicted incorporation of non-native substrates by a polyketide synthase yields bioactive natural product derivatives. *ChemBioChem*, v. 15, n. 13, p. 1991-1997, 2014.

BRETSCHNEIDER, T. *et al.* Vinylogous chain branching catalysed by a dedicated polyketide synthase module. *Nature*, v. 502, n. 7469, p. 124, 2013.

CAFFREY, P. *et al.* Identification of DEBS 1, DEBS 2 and DEBS 3, the multienzyme polypeptides of the erythromycin-producing polyketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*. *FEBS letters*, v. 304, n. 2/3, p. 225-228, 1992.

CHALLIS, G. L. Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 41, n. 2, p. 219-232, 2014.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 14555-14561, 2003. Supplement 2.

CHAN, Y. A. *et al.* Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Natural Product Reports*, v. 26, n. 1, p. 90-114, 2009.

CORTES, J. *et al.* An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature*, v. 348, n. 6297, p. 176, 1990.

COX, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 5, n. 13, p. 2010-2026, 2007.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1/2, p. 72-79, 2005.

DONADIO, S. *et al.* An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 15, p. 7119-7123, 1993.

DONADIO, S. *et al.* Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*, v. 252, n. 5006, p. 675-679, 1991.

DU, L.; LOU, L. PKS and NRPS release mechanisms. *Natural Product Reports*, v. 27, n. 2, p. 255-278, 2010.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, v. 33, n. 11, p. 1569-1582, 1992.

FERRER, J.-L. *et al.* Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 6, n. 8, p. 775, 1999.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.

FLOSS, H. G. Combinatorial biosynthesis-potential and problems. *Journal of Biotechnology*, v. 124, n. 1, p. 242-257, 2006.

HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 48, n. 26, p. 4688-4716, 2009.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, v. 24, n. 2, p. 393-416, 2007.

JI, H.-F.; LI, X.-J.; ZHANG, H.-Y. Natural products and drug discovery. *EMBO Reports*, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.

KATSUYAMA, Y.; OHNISHI, Y. Type III polyketide synthases in microorganisms. In: *METHODS in Enzymology*. Academic Press, [S. I.]: Academic Press, 2012. p. 359-377.

KEATINGE-CLAY, A. T. A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides. *Chemistry & Biology*, v. 14, n. 8, p. 898-908, 2007.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism: from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 12, p. 937, 2005.

KHALDI, N. *et al.* SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, n. 9, p. 736-741, 2010.

KUSHNIR, S. *et al.* Minimally invasive mutagenesis gives rise to a biosynthetic polyketide library. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 51, n. 42, p. 10664-10669, 2012.

MALPARTIDA, F.; HOPWOOD, D. A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature*, v. 309, n. 5967, p. 462-464, 1984.

MEDEMA, M. H. *et al.* antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in

bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, v. 39, p. W339-W346, 2011. Supplement 2.

MEIER, J. L.; BURKART, M. D. The chemical biology of modular biosynthetic enzymes. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 7, p. 2012-2045, 2009.

MOOTZ, H. D.; SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M. A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, v. 3, n. 6, p. 490-504, 2002.

MUSIOL, E. M.; WEBER, T. Discrete acyltransferases involved in polyketide biosynthesis. *MedChemComm*, v. 3, n. 8, p. 871-886, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

O'HAGAN, D. Biosynthesis of fatty acid and polyketide metabolites. *Natural Product Reports*, v. 12, n. 1, p. 1-32, 1995.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from the perspective of combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*, v. 27, n. 4, p. 571-616, 2010.

ŌMURA, S. *et al.* Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 21, p. 12215-12220, 2001.

OSBOURN, A. E.; FIELD, B. Operons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 23, p. 3755-3775, 2009.

OSBOURN, A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in Genetics*, v. 26, n. 10, p. 449-457, 2010.

PAWLIK, K. *et al.* A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Archives of Microbiology*, v. 187, n. 2, p. 87-99, 2007.

PIEL, J. Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Natural Product Reports*, v. 27, n. 7, p. 996-1047, 2010.

RAWLINGS, B. J. Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Natural Product Reports*, v. 16, n. 4, p. 425-484, 1999.

RICHTER, C. D. *et al.* Multienzyme docking in hybrid megasynthetases. *Nature Chemical Biology*, v. 4, n. 1, p. 75, 2008.

RINKEL, J.; DICKSCHAT, J. S. Recent highlights in biosynthesis research using stable isotopes. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 11, n. 1, p. 2493-2508, 2015.

SCHERLACH, K. *et al.* Antimitotic rhizoxin derivatives from a cultured bacterial endosymbiont of the rice pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 35, p. 11529-11536, 2006.

SCHOENHEIMER, R.; RITTENBERG, D. Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. *Science*, v. 82, p. 156-157, 1935.

SCHRÖDER, J. *Comprehensive Natural Products*. Editor U. Sankawa. Oxford: Elsevier, 1999. p. 749-771.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 7, n. 2, p. 285-295, 2003.

SHOOLINGIN-JORDAN, M.; CAMPUZANO, I. D. G. *Comprehensive Natural Products*. Editor U. Sankawa. Oxford: Elsevier, 1999. p. 345-365.

SIMPSON, T. J. Fungal polyketide biosynthesis: a personal perspective. *Natural Product Reports*, v. 31, n. 10, p. 1247-1252, 2014.

SOLECKI, R. S. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science*, v. 190, p. 880-881, 1975.

STANZAK, R. *et al.* Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of clustered erythromycin biosynthesis genes from *Streptomyces erythreus*. *Biotechnology*, v. 4, n. 3, p. 229, 1986.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, v. 18, n. 4, p. 380-416, 2001.

STAUNTON, J.; WILKINSON, B. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. *Chemical Reviews*, v. 97, n. 7, p. 2611-2630, 1997.

SUN, H. *et al.* Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 9, p. 823-833, 2015.

SÜSSMUTH, R. D. *et al.* Fungal cyclooligomer depsipeptides: from classical biochemistry to combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*, v. 28, n. 1, p. 99-124, 2011.

SÜSSMUTH, R. D.; MAINZ, A. Nonribosomal peptide synthesis: principles and prospects. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 56, n. 14, p. 3770-3821, 2017.

SWAMINATHAN, S. *et al.* CYP76M7 is an ent-cassadiene C11 α -hydroxylase defining a second multifunctional diterpenoid biosynthetic gene cluster in rice. *The Plant Cell*, v. 21, n. 10, p. 3315-3325, 2009.

TUAN, J. S. *et al.* Cloning of genes involved in erythromycin biosynthesis from *Saccharopolyspora erythraea* using a novel actinomycete-Escherichia coli cosmid. *Gene*, v. 90, n. 1, p. 21-29, 1990.

VEZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S. N. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, v. 28, n. 10, p. 721-726, 1975.

WALSH, C. T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science*, v. 303, n. 5665, p. 1805-1810, 2004.

WALSH, C. T.; TANG, Y. *Natural product biosynthesis: chemical logic and enzymatic machinery*. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2017. 765 p.

WANG, H. *et al.* Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 25, p. 9259-9264, 2014.

WARD, A. C.; ALLENBY, N. E. Genome mining for the search and discovery of bioactive compounds: the *Streptomyces* paradigm. *FEMS Microbiology Letters*, v. 365, n. 24, p. fny240, 2018.

WEBER, G. *et al.* The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Current Genetics*, v. 26, n. 2, p. 120-125, 1994.

WEBER, J. M.; LOSICK, R. The use of a chromosome integration vector to map erythromycin resistance and production genes in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*). *Gene*, v. 68, n. 2, p. 173-180, 1988.

WEISSMAN, K. J. Genetic engineering of modular PKSs: from combinatorial biosynthesis to synthetic biology. *Natural Product Reports*, v. 33, n. 2, p. 203-230, 2016.

WEISSMAN, K. J. The structural biology of biosynthetic megaenzymes. *Nature Chemical Biology*, v. 11, n. 9, p. 660, 2015.

WENZEL, S. C. *et al.* Nonribosomal peptide biosynthesis: point mutations and module skipping lead to chemical diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 45, n. 14, p. 2296-2301, 2006.

WENZEL, S. C. *et al.* Structure and biosynthesis of myxochromides S1-3 in *Stigmatella aurantiaca*: evidence for an iterative bacterial type I polyketide synthase and for module skipping in nonribosomal peptide biosynthesis. *ChemBioChem*, v. 6, n. 2, p. 375-385, 2005.

WU, J. *et al.* Polyketide double bond biosynthesis. Mechanistic analysis of the dehydratase-containing module 2 of the picromycin/methymycin

polyketide synthase. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 49, p. 17393-17404, 2005.

YOU, Y.-Ok; KHOSLA, C.; CANE, D. E. Stereochemistry of reductions catalyzed by methyl-epimerizing ketoreductase domains of polyketide synthases. *Journal of the American Chemical Society*, v. 135, n. 20, p. 7406-7409, 2013.

YU, D. *et al.* Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *IUBMB life*, v. 64, n. 4, p. 285-295, 2012.

YU, N. *et al.* Delineation of metabolic gene clusters in plant genomes by chromatin signatures. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. 5, p. 2255-2265, 2016.

POTENCIAL ENZIMÁTICO DOS MICRO-ORGANISMOS

Christiana de Fátima Bruce da Silva

Introdução

Nos agroecossistemas tropicais, cuja interferência do homem é marcante, a interação sinérgica entre as plantas e os micro-organismos é fundamental para que ocorra o equilíbrio do sistema, resultando em incrementos na produtividade dos cultivos agrícolas (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Dentro desses ecossistemas, existem micro-organismos que participam das diversas etapas cruciais do sistema solo-água-planta, destacando-se os fungos e as bactérias como os principais responsáveis pelos processos biológicos vitais (Figura 1) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Os micro-organismos são responsáveis pela produção de diversos compostos interessantes, como, por exemplo, as enzimas que participam de eventos como a ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, biodegradação, biorremediação, bioestimulação, indução de resistência e controle biológico de enfermidades (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Os micro-organismos podem habitar os solos, crescendo por entre os agregados, bem como sobrevivendo com suas estruturas de resistência (clamidósporos, esclerócios ou endósporos). Podem ainda ocupar nichos ecológicos os mais diversos, como a madeira, realizando a sua decompo-

sição; a rizosfera (área de atuação das raízes das plantas) e o rizoplaneo (superfície das raízes), utilizando os exsudatos secretados pelas raízes. Além disso, os micro-organismos podem também localizar-se no interior das plantas, estes são conhecidos como endofíticos (MACCHERONI JÚNIOR; ARAÚJO; LIMA, 2004).

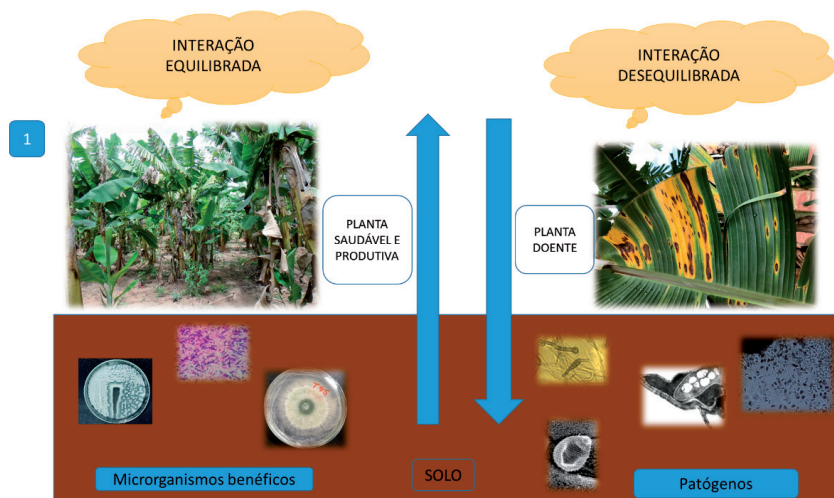
Quando ocorre um equilíbrio no agroecossistema, constata-se a presença de relações benéficas entre os dois atores essenciais nesse sistema: as plantas e os micro-organismos. Dentro desse contexto, podem-se citar as associações mutualísticas que ocorrem entre os fungos endofíticos e as plantas. Esses micro-organismos associam-se com as plantas, obtendo nutrientes e proteção e, ao mesmo tempo, podem proporcionar tolerância às plantas, em ambientes com estresses biótico e abiótico. Por exemplo, os fungos endofíticos competem com os patógenos, por nutrientes e espaço, e podem também produzir enzimas hidrolíticas, suprimindo o patógeno (MACCHERONI JÚNIOR; ARAÚJO; LIMA, 2004). Outros exemplos importantes são os micro-organismos fixadores de nitrogênio atmosférico e os fungos micorrízicos, que proporcionam benefícios às plantas (FIGUEIREDO; BURITY; STAMFORD, 2008; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Entretanto, devido ao cultivo intensivo das culturas agrícolas, aliado ao manejo inadequado do sistema solo-água-plantas, vêm se constatando altas prevalências de enfermidades. Dessa forma, o equilíbrio biológico é “quebrado”, e a presença de micro-organismos fitopatogênicos é marcante. Dentre os patógenos que ocasionam doenças importantes nas culturas agrícolas, destacam-se os fungos, bactérias, nematoides e vírus (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM, 1995; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Alguns fitopatógenos, durante o seu processo de patogênese, são importantes produtores de compostos, apresentando papel preponderante nas infecções. Dentre os compostos, destacam-se as enzimas produzidas pelas diferentes espécies de micro-organismos, tais como: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pectobacterium*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (LIAO; HUNG; CHATTERJEE, 1988; PAYASI; SANWAL; SANWAL, 2009).

Finalmente, para conduzir o manejo sustentável das enfermidades, é imprescindível a utilização dos micro-organismos benéficos,

também conhecidos como antagonistas. Esses micro-organismos utilizam diferentes mecanismos de ação para controlar os patógenos. Nesse cenário, destacam-se as espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* como agentes de controle biológico (BENÍTEZ *et al.*, 2004; HARMAN *et al.*, 2004; PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; VICENTE, 2011; PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014; MARCANO *et al.*, 2016). Esses micro-organismos, além de realizarem o controle biológico de doenças, podem também promover o crescimento das plantas (MORTUZA; ILAG, 1999; GLICK, 2012). Nesse processo de biocontrole de patógenos e bioestimulação das plantas, espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* também são eficientes em produzir enzimas (HARMAN, 2006; PAYASI; SANWAL; SANWAL, 2009). Portanto, a seguir, serão mais bem detalhados os principais eventos, na interação planta – micro-organismo, em que a presença das enzimas é marcante: a patogênese, a promoção do crescimento das plantas e o controle biológico de doenças de plantas (Figura 1).

Figura 1 – Interação entre plantas e micro-organismos nos solos



Fonte: fotos de Christiana Bruce.

(1) Na interação equilibrada, observa-se a presença de micro-organismos benéficos, e as plantas alcançam a produtividade desejada; (2) Em condições de desequilíbrio biológico, a prevalência de patógenos é marcante, resultando na expressão de doenças.

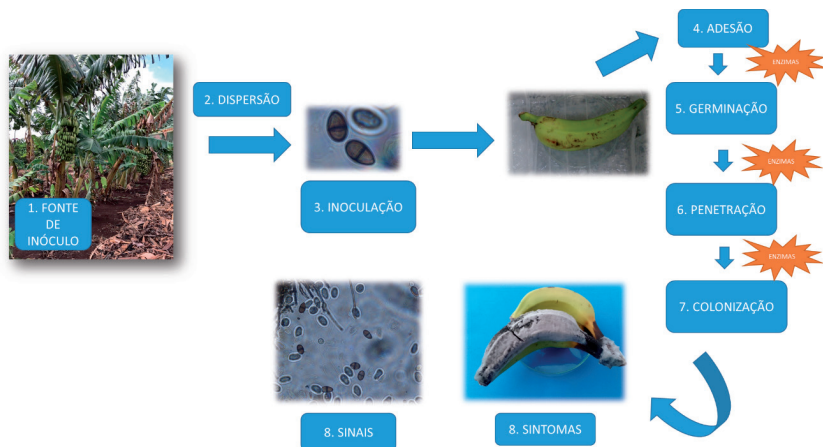
Enzimas e micro-organismos

Para os diferentes micro-organismos e suas interações com as plantas, as enzimas têm apresentado papel marcante. Pode-se destacar a importância das enzimas, para os eventos da **patogênese**, que vão culminar com a expressão de doenças. Nesse caso, os micro-organismos são fitopatogênicos e produzem/secretam as enzimas, nos nichos de infecção, provocando as alterações fisiológicas nas plantas. Existem também casos em que os micro-organismos são benéficos, produzindo/secretando as enzimas importantes para o controle de fitopatógenos (**controle biológico**) ou para a **promoção de crescimento** das plantas. Adicionalmente, as plantas também podem contra-atacar e produzir enzimas para **resistir** aos patógenos ou **tolerar** estes. Portanto, a seguir, serão mais bem detalhados esses eventos e será mostrado como ocorre o envolvimento das enzimas em cada uma dessas etapas essenciais da interação plantas – micro-organismos.

Enzimas e a patogênese

No processo de patogênese, uma série de eventos no ciclo das relações patógeno – hospedeiro ocorre para que culmine com a expressão dos sintomas de doenças (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012). Em muitos desses eventos (adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução), a participação das enzimas tem sido característica marcante, proporcionando alterações fisiológicas nas plantas (Figura 2). Entre as enzimas de importância na patogênese, podemos destacar as poligalacturonases, cutinases, proteases, pectinases e celulasas (VAN DEN ENDE; LINSKENS, 1974; DE LORENZO; D’OVIDIO; CERVONE, 2001; TOTH *et al.*, 2003; NITURE, 2008; PHAN; HERBST; MONTAG, 2011; PFEILMEIER; CALY; MALONE, 2016). Muitos fitopatógenos produzem essas enzimas e as secretam, principalmente, pelo sistema de secreção tipo II (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012).

Figura 2 – Ciclo das relações patógeno – hospedeiro de fungos fitopatogênicos



Fonte: fotos de Christiana Bruce.

O evento tem início com a presença da (1) fonte de inóculo (conídios do patógeno) em restos de cultura no campo, (2) dispersão do inóculo, (3) inoculação em hospedeiro sadio, (4) adesão, (5) germinação, (6) penetração, (7) colonização e (8) expressão da doença (presença de sintomas e sinais). A participação das enzimas nas fases de adesão, germinação, penetração e colonização é destacada.

No ciclo das relações patógeno – hospedeiro, um dos primeiros atores essenciais para a ocorrência da infecção é a fonte de inóculo, a qual é constituída, essencialmente, pelas estruturas do patógeno (esporos, micélio, corpos de frutificação, células bacterianas, juvenis e/ou fêmeas de nematoides). Essas estruturas dispersam-se por diferentes vias (vento, água ou por movimentação própria) e atingem a superfície do hospedeiro. Dessa forma, o próximo evento no ciclo tem início: a adesão (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012). Na adesão, a primeira barreira que protege as plantas contra os patógenos é a cutícula. Ela é constituída, basicamente, da membrana, formada pela cutina, celulose e ceras e pela parede celular, com a presença da pectina (VAN DEN ENDE; LINSKENS, 1974). A presença da cutícula tem importância na adesão do patógeno e nos eventos posteriores, que são a germinação e a penetração (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012). Ainda na fase de adesão, a participação de enzimas como as esterases e cutinases tem sido

constatada para diferentes patógenos, como, por exemplo, as ferugens. Essas enzimas facilitam a adesão dos esporos do patógeno no tecido do hospedeiro (DEISING *et al.*, 1992). Outras enzimas têm apresentado importância na degradação da parede celular, como as celulasas e β -glicosidase, de fungos como *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* (KUBICEK; STARR; GLASS, 2014). Após a adesão das estruturas do patógeno na superfície hospedeira, se as condições forem favoráveis, inicia-se a fase de germinação. A presença de exsudatos na superfície hospedeira pode apresentar influência na atividade enzimática dos micro-organismos (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012).

O próximo evento no ciclo é a penetração. Para penetrar no tecido do hospedeiro, os patógenos utilizam diferentes vias, como os ferimentos, aberturas naturais e diretamente, pela superfície intacta do hospedeiro. A penetração, via superfície intacta do hospedeiro, pode ser realizada mecanicamente, através de estruturas conhecidas como apressórios, por atividade enzimática, ou por ambos os mecanismos (VAN DEN ENDE; LINSKENS, 1974; DEISING *et al.*, 1995; MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996; ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012; PFEILMEIER; CALY; MALONE, 2016). Durante a penetração via apressório, a presença de enzimas como as esterases é marcante em alguns patossistemas (NICHOLSON; KUC; WILLIAMS, 1972).

Na penetração, por meio da atividade enzimática, os fungos podem utilizar enzimas que degradam a cutícula, como as cutinases (VAN DEN ENDE; LINSKENS, 1974). Esse tipo de penetração pela cutícula depende do patossistema envolvido (KOLATTUKUDY, 1985). Para alguns patógenos, como *Rhizoctonia solani*, agente causal de tombamento em mudas, e *Colletotrichum graminicola*, responsável pela antracnose em vários cereais, a presença da cutinase é importante para o avanço das infecções por esses patógenos (BAKER; BATEMAN, 1978). Outras enzimas podem também participar do processo de penetração dos patógenos no tecido do hospedeiro. Por exemplo, as camadas pécticas da parede celular e da lamela média podem sofrer ação

das enzimas pectato liase, pectina liase, pectina metil esterase e poligalacturonase (BARRAS; VAN GIJSEGEM; CHATTERJEE, 1994; PAYASI; SANWAL; SANWAL, 2009). Adicionalmente, vale destacar que muitos patógenos de solo produzem também enzimas. Entre os patógenos, destacam-se *Pectobacterium carotovorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina* (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Após a penetração no tecido hospedeiro, verifica-se também a atividade enzimática próxima ao halo onde se encontra a hifa “peg de penetração” (EMMETT; PARBERY, 1975). Ainda durante a fase de penetração e colonização, observa-se que, em patossistemas que apresentam o fenômeno da quiescência, a penetração no tecido do hospedeiro é inibida devido à presença de compostos fenólicos, como a epicatequina. Com o amadurecimento dos frutos, os níveis da epicatequina decrescem, e as lipoxigenases do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* podem atuar, ocasionando a antracnose em frutos (PRUSKY; PLUMBLEY, 1992).

Já na colonização, ocorrem o crescimento e a reprodução do patógeno. Na reprodução, são produzidos os esporos sexuais e assexuais dos fungos; a fissão de células bacterianas; e a deposição de ovos pelos nematoides (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012). Para alguns patógenos fúngicos, os esporos (conídios) são produzidos numa massa mucilaginosa, constituída de glicoproteínas, enzimas e compostos inibidores da germinação. Por exemplo, para o patógeno *C. graminicola*, a massa mucilaginosa contém quatro cutinases, pertencentes à classe da serina esterase hidrolase (PASCHOLATI *et al.*, 1993).

Adicionalmente, as enzimas têm sido também constatadas por serem fatores de patogenicidade ou virulência em diferentes patossistemas (ROGERS; FLAISHMAN; KOLATTUKUDY, 1994; WALKER; REEVES; SALMOND, 1994). Por exemplo, no patossistema *Fusarium solani* f. sp. *pisi* x *Pisum sativum*, plantas inoculadas com os isolados do patógeno contendo uma mutação no gene relacionado à produção da enzima cutinase apresentavam menores lesões do que plantas inoculadas com os isolados sem a mutação. Nesse pa-

tossistema, ficou evidente a perda da virulência do isolado mutante, devido a uma mutação do gene relacionado à cutinase (ROGERS; FLAISHMAN; KOLATTUKUDY, 1994). Dessa forma, para que a infecção pelos patógenos seja bem-sucedida, a participação dos fatores de patogenicidade ou virulência, como as enzimas, nas interações planta-patógeno é de fundamental importância. Portanto, a seguir, serão descritos, detalhadamente, o patógeno *Pectobacterium carotovorum*, agente causal da doença conhecida como podridão mole, e o principal mecanismo da sua patogênese, a produção de enzimas pécticas.

Patogênese: um exemplo com o patógeno *Pectobacterium carotovorum*

A bactéria fitopatogênica *Pectobacterium carotovorum*, agente causal da doença conhecida como podridão mole, em diferentes hospedeiros, é um exemplo marcante de micro-organismo que produz enzimas necessárias para as infecções. As enzimas produzidas por essa bactéria são consideradas fatores de patogenicidade ou virulência, em muitos patossistemas (BATEMAN; MILLAR, 1966; COLLMER; KEEN, 1986; MARIANO *et al.*, 2005).

Durante o processo de infecção, ocorre uma série de alterações no hospedeiro, tais como acumulação de compostos, mudanças no padrão respiratório e na permeabilidade das membranas, que podem também interferir no modo de ação e na atividade enzimática nos tecidos do hospedeiro (BATEMAN; MILLAR, 1966). Dentro desse contexto, verifica-se que as principais enzimas envolvidas na patogênese de *P. carotovorum* são as pectinolíticas, as quais têm atuação nos compostos pécticos da lamela média, da parede celular. Com a sua atuação, ocorre a desintegração dos tecidos, facilitando a infecção pelo patógeno e, como resultado, a presença dos sintomas e sinais típicos da enfermidade: necrose, podridão mole, pus bacteriano e odor fétido (Figura 3) (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005; ABBOTT; BORASTON, 2008).

Figura 3 – Sintomas (necrose e podridão mole) e sinais (pus bacteriano e odor fétido) em tubérculo de batata



Fonte: foto de Christiana Bruce.

A fitobactéria *Pectobacterium carotovorum* utiliza enzimas pectinolíticas para degradar a parede celular dos seus hospedeiros.

As principais enzimas envolvidas na degradação das substâncias pécnicas da lamela média são as poligalacturonases (Peh), pectato liase (Pel), pectina liase (Pnl) e pectina metil esterase (Pme). Já outras enzimas têm papel fundamental na degradação da celulose (celulases) e de glicoproteínas (proteases) da parede celular (COLLMER; KEEN, 1986; DAHLER; BARRAS; KEEN, 1990).

Para secretar as enzimas pécnicas no tecido do hospedeiro, *P. carotovorum* pode utilizar os três tipos de sistemas de secreção (I, II e III), com diferentes mecanismos, que parecem ser conservados nessa espécie. Essas enzimas secretadas são importantes fatores de patogenicidade, como as proteases, relacionadas ao sistema de secreção tipo I (DAHLER; BARRAS; KEEN, 1990), e as pectinases e celulases, associadas ao sistema de secreção tipo II (ANDRO *et al.*, 1984). Já o sistema de secreção tipo III possui relação com as respostas de hipersensibilidade (HR) e patogenicidade, translocando proteínas necessárias para ocasionar infecção em plantas hospedeiras (reação incompatível) e HR em plantas não hospedeiras (reação compatível) (LAHAYE; BONAS, 2001). Vale destacar que as enzimas pécnicas são também importantes fatores de patogenicidade para outros patógenos ocasionarem enfermidades nas plantas, tais como: *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*

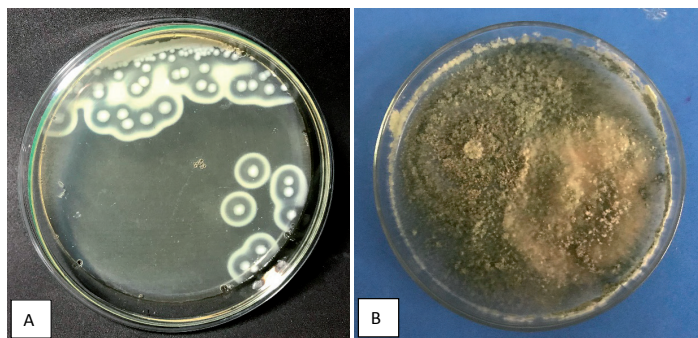
f. sp. *lycopersici*, (PAQUIN; COULOMBE, 1962; MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005; XUE *et al.*, 2018).

Enzimas e a promoção do crescimento em plantas

Os micro-organismos promotores de crescimento, como os fungos e as bactérias, podem ser encontrados em diferentes nichos ecológicos, como a rizosfera e a filosfera (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007; SILVA; BETTIOL, 2009). Nesses nichos, para promover o crescimento das plantas, os micro-organismos utilizam mecanismos de ação diretos e indiretos. Os mecanismos diretos estão relacionados à solubilização do fosfato, produções de antibióticos, fito-hormônios e sideróforos. Já os mecanismos indiretos estão intimamente relacionados à produção de celulases, proteases, amilases, ureases, lipases, entre outras enzimas (GLICK, 2012).

Entre os micro-organismos promotores de crescimento, as espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* destacam-se como as mais utilizadas na agricultura (BENÍTEZ *et al.*, 2004; PÉREZ MONTAÑO *et al.*, 2014). No caso de *Bacillus*, a sua ampla adoção como promotor de crescimento deve-se à facilidade no seu cultivo e à formação de esporos de resistência, os endósporos (CHOUDHARY; JOHRI, 2009; KUMAR; DUBEY; MAHESWARI, 2012). Por sua vez, *Trichoderma* também tem apresentado facilidade no cultivo e demonstra ser um fungo com grande capacidade de esporulação. Essa característica facilita a obtenção de bioformulados do micro-organismo (Figura 4) (PAPAVIZAS, 1985).

Figura 4 – Colônias típicas de micro-organismos promotores de crescimento

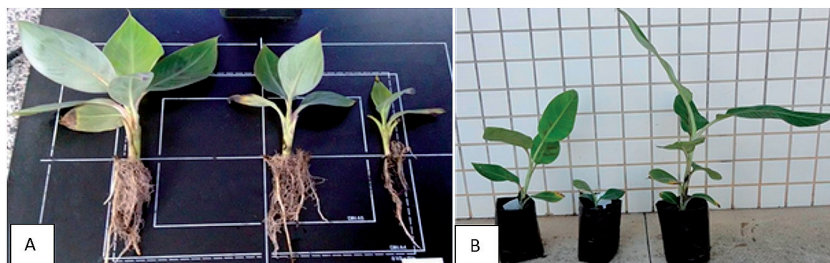


Fonte: fotos de Christiana Bruce.

(A) Colônias de isolado de *Bacillus* sp.; (B) Colônias de isolado de *Trichoderma harzianum*.

Para promover o crescimento das plantas, as espécies de *Bacillus* e *Trichoderma*, por meio dos mecanismos indiretos, podem produzir compostos, como as enzimas. Com a utilização desses mecanismos, os micro-organismos promovem o crescimento/desenvolvimento das plantas, culminando com incrementos na produtividade das culturas (GLICK, 2012). Por exemplo, isolados de *B. pumilus* (RAB9 e E2) foram capazes de produzir celulases, amilases, pectinases, lipases e proteases, enzimas relacionadas à promoção de crescimento, em mudas de bananeira (*Musa* spp.). As mudas inoculadas com esses micro-organismos estavam nas fases de aclimatização e cultivo em sacos, sob condições de casa de vegetação, na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE). Após esse período de cultivo, puderam-se observar ganhos em altura, comprimento da raiz, massa seca da raiz, diâmetro do pseudocaule e área foliar das plantas inoculadas com os isolados de *Bacillus* RAB9 e E2 (Figura 5) (SILVA *et al.*, 2018).

Figura 5 – Promoção do crescimento de mudas micropropagadas de bananeira por isolados de *Bacillus pumilus*



Fonte: fotos de Silva *et al.* (2018).

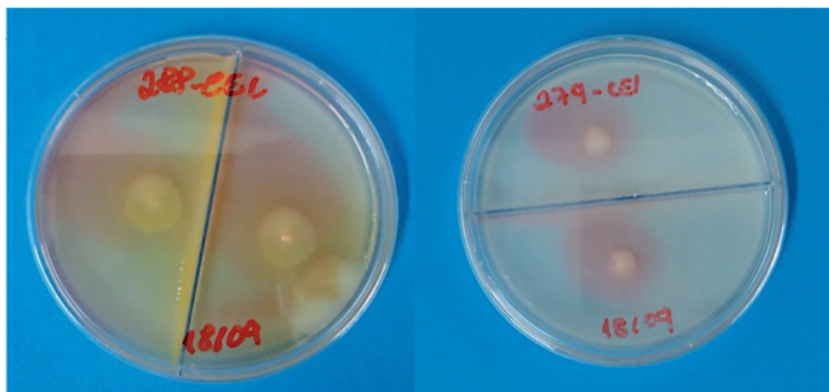
(A) Mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata Catarina tratadas e não tratadas com a biomassa bacteriana, após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE). Tratamentos: RAB9, E2 e controle (esquerda para direita), respectivamente; (B) Mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata Catarina tratadas e não tratadas com a biomassa bacteriana, após 120 dias de plantio. Tratamentos: E2, controle e RAB9 (esquerda para direita), respectivamente.

Entre as enzimas produzidas pelos micro-organismos, durante a fixação biológica do nitrogênio, a participação do complexo enzimático denominado nitrogênase é fundamental. Esse complexo converte

o nitrogênio (N_2) em amônia (NH_3), disponibilizando-a para as plantas e desempenhando um papel importante na agricultura, pois a ureia é utilizada como a fonte de nitrogênio. A principal enzima contida no solo, que hidrolisa a ureia, é a urease. A sua atividade é um indicador da qualidade biológica do solo, sendo influenciada por fatores como pH, teor de carbono e metais pesados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Na detecção da produção da enzima urease pelos micro-organismos, muitos são as provas bioquímicas que podem ser utilizadas. Uma delas é a suplementação de meios de cultura *in vitro* com ureia. Se os micro-organismos produzirem a enzima urease, é evidenciada a formação de halo claro ao redor das colônias (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Outra enzima produzida pelos micro-organismos que é importante na promoção de crescimento das plantas e que tem participação no ciclo do carbono é a celulase. Essa enzima degrada a celulose, liberando açúcares solúveis e glicose para as plantas (TÓTOLA; CHAER, 2002). A sua detecção pode ser realizada por testes *in vitro*, com a suplementação de meios de cultura com celulose microcristalizada. A produção pelo micro-organismo da enzima culmina com a formação de uma zona clara em torno das colônias (Figura 6), (adaptado de CATTELAN, 1999).

Figura 6 – Produção de celulase pelos isolados de *Bacillus* sp.

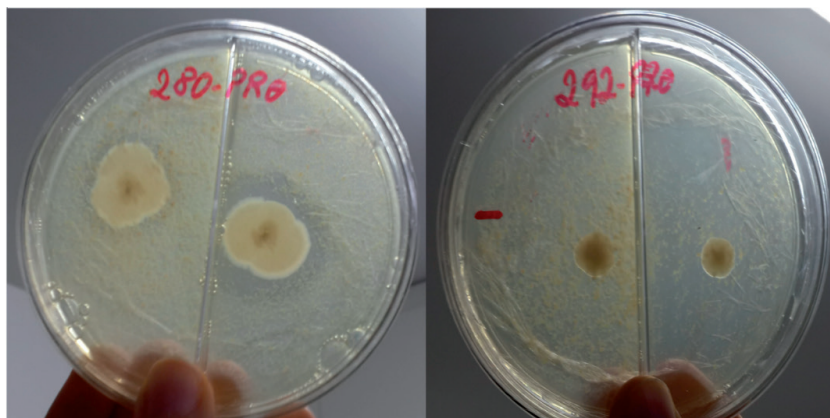


Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

O isolado 288 apresentou a formação de halo claro ao redor das colônias (esquerda), em contraste com a não formação de halo isolado 279 (direita).

A protease é uma enzima também efetiva na promoção de crescimento das plantas. Assim como as ureases, a protease também participa da ciclagem do nitrogênio nos solos (TÓTOLA; CHAER, 2002). A constatação da sua produção pelos micro-organismos pode ser realizada por testes *in vitro* de detecção da formação de halos mais claros ao redor das colônias microbianas (adaptado de VERMELHO *et al.*, 1996) (Figura 7).

Figura 7 – Produção de protease pelos isolados de *Bacillus* sp.

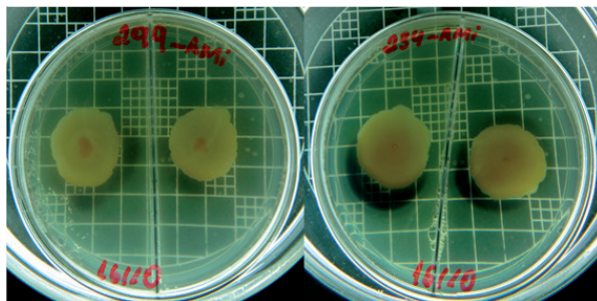


Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

O isolado 280 apresentou a formação de halo claro ao redor das colônias (esquerda), em contraste com a não formação de halo do isolado 292 (direita).

A amilase também é uma enzima importante na promoção de crescimento das plantas. Essa enzima tem papel preponderante na clivagem do amido, principal polissacarídeo de reserva presente nas raízes, sementes e tubérculos (PANDEY *et al.*, 2000). A constatação da sua produção pelos micro-organismos pode também ser realizada por testes *in vitro* de detecção da formação de halos mais claros ao redor das colônias microbianas (Figura 8) (adaptado de SILVA *et al.*, 2017).

Figura 8 – Produção de amilase pelos isolados de *Bacillus* sp.

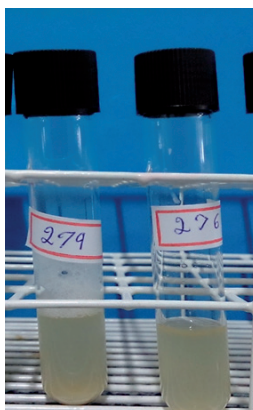


Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

Os isolados 299 e 234 de *Bacillus* apresentaram a formação de halo claro ao redor das colônias.

Outra enzima importante, por proteger as plantas contra os estresses ambientais, é a catalase. A produção da catalase pelos micro-organismos proporciona a tolerância das plantas a estresses abióticos. Dessa forma, permite, indiretamente, o crescimento/desenvolvimento das plantas (ISLAM *et al.*, 2016). Para detecção da atividade da enzima catalase pelos micro-organismos, os testes *in vitro* com solução de peróxido de hidrogênio permitem a visualização de bolhas características da sua formação (Figura 9) (adaptado de ZURITA; MEJÍA; GUZMÁN-BLANCO, 2010).

Figura 9 – Produção de catalase pelos isolados de *Bacillus* sp.

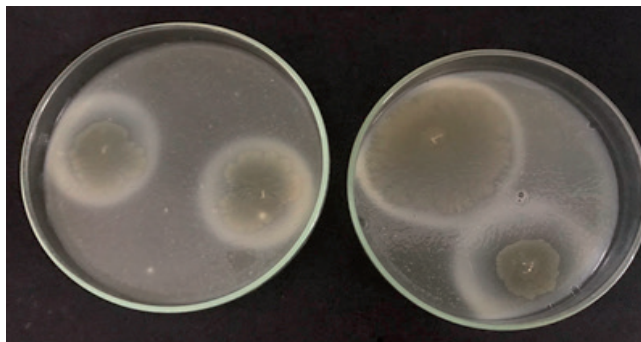


Fonte: foto de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

O isolado 279 apresentou a formação de bolhas (esquerda), em contraste com a não formação do isolado 276 (direita).

Por fim, outro mecanismo importante dos micro-organismos para promover o crescimento das plantas é a solubilização do fosfato. Muitos micro-organismos conseguem solubilizar o fosfato da sua forma insolúvel para aquela prontamente assimilável para as plantas, utilizando as enzimas. Algumas das enzimas envolvidas são as fosfatases e fitases (RODRÍGUEZ *et al.*, 2006). Para detectar a produção de fosfatase pelos micro-organismos, a realização de testes *in vitro*, com meios de culturas suplementados com fontes de fósforo (fosfato de cálcio ou fosfato de potássio), proporciona a visualização de halos claros ao redor das colônias dos micro-organismos produtores dessa enzima (Figura 10) (CATTELAN, 1999).

Figura 10 – Solubilização do fosfato por isolados de *Bacillus* sp.



Fonte: foto de Christiana Bruce.

O isolado 186 apresentou produção de enzimas com a formação de halo mais claro ao redor das colônias bacterianas.

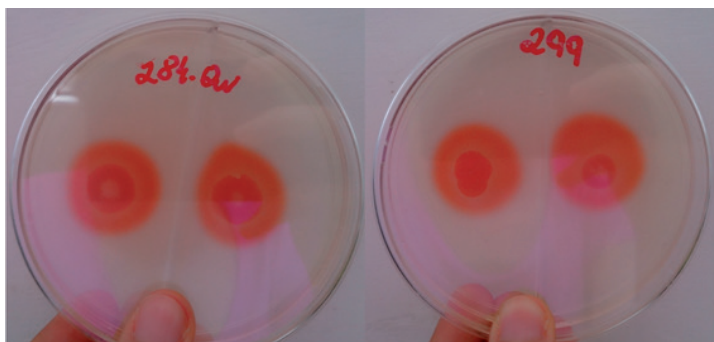
Enzimas e o controle biológico de plantas

Além de promoverem o crescimento/desenvolvimento das plantas, muitos dos micro-organismos benéficos podem também realizar o controle biológico das doenças incidentes nas diferentes espécies vegetais. O controle biológico é um método de controle ambientalmente sustentável, e a sua adoção deve ser estimulada, dentro do contexto de manejo integrado nos sistemas de produção agrícolas. Os micro-organismos benéficos que apresentam atuação

sobre os patógenos são conhecidos como agentes de controle biológico ou antagonistas (COOK; BAKER, 1983). Entre as espécies mais utilizadas como antagonistas, destacam-se *Bacillus* e *Trichoderma* (BENÍTEZ *et al.*, 2004; RADHAKRISHNAN; HASHEM; ALLAH, 2017). Esses micro-organismos têm apresentado o maior número de princípios ativos registrados para o controle de doenças de plantas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2019).

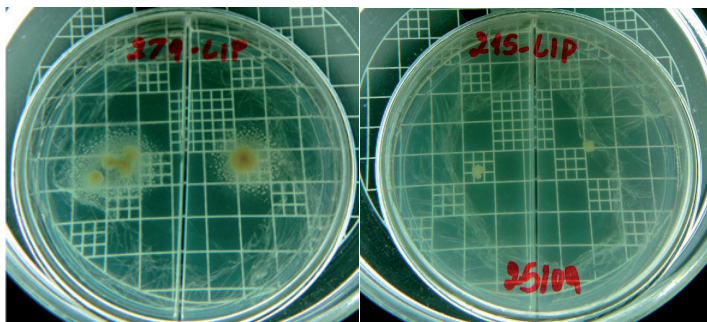
Para realizar o biocontrole, os antagonistas utilizam diferentes mecanismos de ação. Os principais mecanismos envolvidos no controle biológico são o antagonismo direto, com a produção de metabólitos; indução de resistência; competição por nutrientes e espaço e o parasitismo (CHIN-A WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003; ROMEIRO, 2007). No processo de antagonismo direto, há a participação de enzimas que atuam na degradação da parede celular, como as quitosanases, proteases, celulasas e glucanases (KUBICEK; MACH; PETERBAUER, 2001; CHIN-A WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003; RADHAKRISHNAN; HASHEM; ALLAH, 2017). Em vários trabalhos, é evidenciada a importância fundamental das enzimas no biocontrole de fitopatógenos. Por exemplo, a produção de enzimas quitinolíticas pela bactéria *Paenibacillus* sp., como a quitinase e β -1,3 glucanase, proporcionou a lise da parede celular do patógeno *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (SINGH *et al.*, 1999). Por sua vez, a utilização de isolados de *Bacillus* spp. produtores das enzimas protease e quitinase apresentou a inibição do crescimento micelial de diferentes fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *S. oryzae* (SEITH; MUKHERJEE, 2018).

Em estudos conduzidos no Laboratório de Patologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE), foi constatado que diferentes isolados de *Bacillus*, provenientes da rizosfera de bananeiras, produziam *in vitro* enzimas voltadas para o controle biológico de patógenos. As enzimas mais marcantes produzidas por esses isolados bacterianos foram a quitinase (Figura 11) e a lipase (Figura 12) (dados ainda não publicados).

Figura 11 – Produção de quitinase *in vitro* pelos isolados de *Bacillus* sp.

Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

Os isolados 284 e 299 de *Bacillus* apresentaram a formação de halo claro ao redor das colônias, após a revelação com corante vermelho congo.

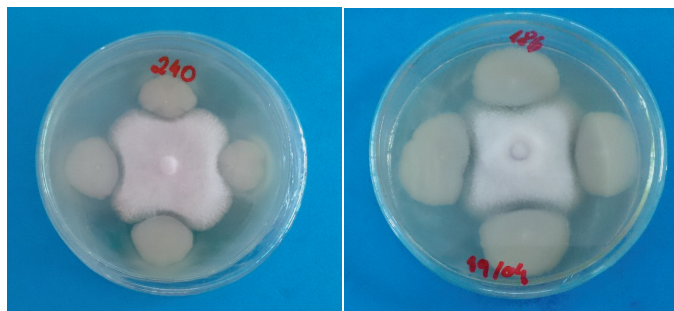
Figura 12 – Produção de lipase *in vitro* pelos isolados de *Bacillus* sp.

Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

O isolado 279 produziu a enzima lipase, com a formação de cristais ao redor das colônias bacterianas (esquerda). Já o isolado 215 não produziu a enzima (direita).

A produção dessas enzimas pelos micro-organismos antagonistas tem importância fundamental no biocontrole, pois esses metabólitos atuam na degradação da parede celular dos fitopatógenos, agentes causais de doenças de plantas (CHIN-A WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003). Pode-se visualizar o efeito das enzimas *in vitro*, por exemplo, pela inibição do crescimento micelial dos patógenos (Figura 13). O mecanismo envolvido, nesse caso, foi o antagonismo direto.

Figura 13 – Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), pelo método do pareamento de culturas



Fonte: fotos de Christiana Bruce e Francisco Henrique Alves.

As colônias do antagonista *Bacillus* estavam localizadas em quatro pontos equidistantes do centro da placa de Petri, enquanto as colônias do patógeno FOC estavam localizadas no centro das placas de Petri. (A) Placa contendo o isolado 240 de *Bacillus* e o patógeno FOC (colônia ao centro da placa de Petri); (B) Placa contendo o isolado 186 de *Bacillus* e o patógeno FOC. Todas as placas estão com cinco dias de crescimento.

Outro mecanismo de ação apresentado pelos antagonistas, em que a participação de enzimas tem característica marcante, é o parasitismo. Por exemplo, no processo de micoparasitismo, realizado por espécies de *Trichoderma* em hifas de *Rhizoctonia solani* (importante patógeno causador de tombamentos de mudas), ocorre a expressão de diferentes enzimas responsáveis pela degradação da parede celular do patógeno (HARMAN *et al.*, 2004). As enzimas produzidas pelas espécies de *Trichoderma* responsáveis pelo micoparasitismo são as β -1,3 glucanase (NORONHA; ULHOA, 2000; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012), quitinases (KUBICEK; MACH; PETERBAUER, 2001; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012), quitosanases, proteases (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012), L-aminoácido oxidase (CHENG; YANG; PENG, 2012), entre outras. Dessa forma, é essencial que ocorra a secreção do arsenal de enzimas dos micro-organismos antagonistas para que os seus mecanismos de ação sejam eficientes no biocontrole dos patógenos de plantas.

Considerações finais

As enzimas são importantes metabólitos produzidos pelos diferentes micro-organismos, que interagem com as plantas. Os micro-organismos

produtores desses compostos podem utilizar-se das enzimas para adentrar no tecido do hospedeiro, ocasionando doenças nas plantas. Mas também as enzimas são fundamentais em ações benéficas para as plantas, como a promoção do crescimento vegetal e o controle de fitopatógenos. Portanto, o entendimento do papel desses metabólitos nas interações planta – micro-organismos é de fundamental importância dentro dos agroecossistemas agrícolas.

Referências

ABBOT, D. W.; BORASTON, A. B. Structural biology of pectin degradation by *Enterobacteriaceae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, United States, v. 72, n. 2. p. 301-316, June 2008.

ANDRO, T. *et al.* Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *Journal of Bacteriology*, United States, v. 160, n. 3, p. 1199-1203, Dec. 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO. 2019. Disponível em: <http://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados>. Acesso em: 10 jan. 2019.

BAKER, C. J.; BATEMAN, D. F. Cutin degradation by plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 68, n. 11, p. 1577-1584, Nov. 1978.

BARRAS, F.; VAN GIJSEGEM, F.; CHATTERJEE, A. K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 32, p. 201-234, Sept. 1994.

BATEMAN, D. F.; MILLAR, R. L. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 4, p. 119-144, Sept. 1966.

BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, Spain, v. 7, n. 4, p. 249-260, Dec. 2004.

BERGAMIN FILHO, A. *et al.* (ed.). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. *Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1996. 289 p.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. *Microbiologia do solo*. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (org.). *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. p. 79-96.

CATTELAN, A. J. *Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal*. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36 p.

CHENG, C-H.; YANG, C-A.; PENG, K-C. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 102, n. 11, p. 1054-1063, Nov. 2012.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Phenazines in their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, Lancaster, v. 157, n. 3, p. 503-523, Mar. 2003.

CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, Germany, v. 164, n. 5, p. 493-513, Oct. 2009.

COLLMER, A.; KEEN, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 24, p. 383-429, Sept. 1986.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. Saint Paul, Minnesota: APS PRESS, 1983. 539 p.

DAHLER, G. S.; BARRAS, F.; KEEN, N. T. Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Journal of Bacteriology*, United States, v. 172, n. 10, p. 5803-5815, Oct. 1990.

DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 39, p. 313-335, Sept. 2001.

DEISING, H. *et al.* Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *The Plant Cell*, United States, v. 4, n. 1, p. 1101-1111, Sept. 1992.

DEISING, H. *et al.* Differentiation and cell wall degrading enzymes in the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Canadian Journal of Botany*, Canada, v. 73, p. 624-631, 1995. Supplement 1.

EMMETT, R. W.; PARBERRY, D. G. Appressoria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 13, p. 147-165, Sept. 1975.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510 p.

FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.* *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba: Agrolivros, 2008. 568 p.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, London, v. 2012, p. 1-15, Sept. 2012.

GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, Great Britain, v. 158, p. 26-34, Jan. 2012.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, United States, v. 67, n. 3, p. 597-607, May/June 1975.

HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 2, n. 1, p. 43-56, Jan. 2004.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 96, n. 2, p. 190-194, Feb. 2006.

ISLAM, F. *et al.* Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiate* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility. *Plant Growth Regulation*, Netherlands, v. 80, n. 1, p. 23-36, Sept. 2016.

KOLATTUKUDY, P. E. Enzymation penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 23, p. 223-250, Sept. 1985.

KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. J. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 5, n. 10, p. 336-351, Apr. 2012.

KUBICEK, C. P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, Bari, v. 83, n. 2, p. 11-23, Sept. 2001.

KUBICEK, C. P.; STARR, T. L.; GLASS, N. L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 52, p. 427-451, Aug. 2014.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, Germany, v. 167, n. 8, p. 493-499, Sept. 2012.

LAHAYE, T.; BONAS, U. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends in Plant Science*, Bethesda, v. 6, n. 10, p. 479-485, Oct. 2001.

LIAO, C-H.; HUNG, H-Y.; CHATTERJEE, A. K. An extracellular pectate lyase is the pathogenicity factor of the soft rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Palo Alto, v. 1, n. 5, p. 199-206, Jan. 1988.

MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (org.). *Fungos: uma*

introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004. p. 451-490.

MARCANO, I.-E. *et al.* Assessment of bacterial populations associated with banana tree roots and development of successful plant probiotics for banana crop. *Soil Biology & Biochemistry*, United Kingdom, v. 99, p. 1-20, Aug. 2016.

MARIANO, R. L. R. *et al.* Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma*, Recife, v. 2, p. 121-153, dez. 2005.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 34, p. 367-386, Sept. 1996.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 398 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (ed.). *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MORTUZA, M. G.; ILAG, L. L. Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. *Biological Control*, Switzerland, v. 15, n. 3, p. 235-240, July 1999.

NICHOLSON, R. L.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 62, n. 11, p. 1242-1247, Nov. 1972.

NITURE, S. K. Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*, Bratislava, v. 63, n. 1, p. 1-19, 2008.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDaL-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, Bethesda, v. 183, n. 1, p. 119-123, Feb. 2000.

PANDEY, A. *et al.* Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Winnipeg, v. 31, n. 2, p. 135-152, Apr. 2000.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 23, p. 23-54, Sept. 1985.

PAQUIN, R.; COULOMBE, L. J. Pectin enzyme synthesis in relation to virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen. *Canadian Journal of Botany*, Canada, v. 40, n. 4, p. 533-541, Apr. 1962.

PASCHOLATI, S. F. *et al.* Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, England, v. 42, p. 37-51, Jan. 1993.

PAYASI, A.; SANWAL, R.; SANWAL, G. G. Microbial pectate lyases: characterization and enzymological properties. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, Switzerland, v. 25, n. 1, p. 1-14, Jan. 2009.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, England, v. 22, n. 2, p. 187-193, Apr. 2011.

PÉREZ-MONTAÑO, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, Germany, v. 169, n. 5/6, p. 325-336, May/June 2014.

PFEILMEIER, S.; CALY, D. L.; MALONE, J. G. Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective. *Molecular Plant Pathology*, England, v. 17, n. 8, p. 1298-1313, Oct. 2016.

PHAN, T. D.; HERBST, F.; MONTAG, F. *Xanthomonas*. Munich, dez. 2011. Disponível em: <https://vimeo.com/34378870>. Acesso em: 3 nov. 2018.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R. A. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (org.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. England: CAB International, 1992. p. 289-307.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ALLAH, E. F. A. *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiology*, Switzerland, v. 8, n. 9, p. 1-14, Sept. 2017.

RODRÍGUEZ, H. *et al.* Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 287, n. 1/2, p. 15-21, 2006.

ROGERS, L. M.; FLAISHMAN, M. A.; KOLATTUKUDY, P. E. Cutinase gene disruption in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* decreases its virulence on pea. *The Plant Cell*, United States, v. 6, n. 7, p. 935-945, July 1994.

ROMEIRO, R. S. *Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. 269 p.

SEITH, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Screening of biocontrol potential of indigenous *Bacillus* spp. isolated from rice rhizosphere against *R. solani*, *S. oryzae*, *S. rolfsii* and response towards growth of rice. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, India, v. 12, n. 1, p. 41-53, Mar. 2018.

SILVA, C. F. B. *et al.* Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 22, n. 11, p. 782-787, Sept. 2018.

SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W. Microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro e de promoção de crescimento. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (org.). *Biocontrole*

de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 277-287.

SILVA, L. A. F. *et al.* Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa. *Caderno de Ciências Agrárias*, Montes Claros, v. 9, n. 3, p. 49-53, dez. 2017.

SINGH, P. *et al.* Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 89, n. 1, p. 92-99, Jan. 1999.

TOTH, I. K. *et al.* Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, England, v. 4, n. 1, p. 17-30, Jan. 2003.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. *Tópicos em Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 2, p. 195-276, Jan. 2002.

VAN DEN ENDE, G.; LINSKENS, H. F. Cutinolytic enzymes in relation to pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 12, p. 247-258, Sept. 1974.

VERMELHO, A. B. *et al.* Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p. 755-760, Nov./Dec. 1996.

WALKER, D. S.; REEVES, P. J.; SALMOND, G. P. C. The major secreted cellulase, CeIV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important soft rot virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 7, n. 3, p. 425-431, May 1994.

XUE, C. Y. *et al.* Cell-wall-degrading enzymes produced in vitro and in vivo by *Rhizoctonia solani*, the causative fungus of peanut sheath blight. *Peer J*, Bethesda, v. 6, p. 1-22, Sept. 2018.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C. O ciclo das doenças. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. (org.). *O essencial da fitopatologia: agentes causais*. Viçosa, MG: UFV, 2012. p. 111-140.

ZURITA, J.; MEJÍA, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v. 14, p. 97-107, dez. 2010. Suplemento 2.

OS AUTORES

Antônia Torres Ávila Pimenta

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), mestrado em Química Orgânica de Produtos Naturais e doutorado em Química pela mesma universidade. Tem experiência na área de química de produtos naturais, atuando principalmente na investigação química/farmacológica de plantas e micro-organismos do estado do Ceará. Atualmente, é professora adjunta do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Christiana de Fátima Bruce da Silva

Graduada em Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, 2004). Possui mestrado em Fitopatologia, na área de Epidemiologia de Doenças de Plantas (2006), e doutorado em Fitopatologia, na área de Patologia Pós-colheita e Epidemiologia de Doenças de Plantas (2010), ambos pela Universidade Federal de Viçosa. Atualmente, é pesquisadora A em Fitopatologia na Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), atuando principalmente nas seguintes áreas: promoção do crescimento de plantas, controle biológico de doenças de plantas, interação planta-patógeno e patologia pós-colheita de frutas tropicais.

Débora Bezerra de Sousa

Obteve licenciatura em Química na Universidade Estadual do Ceará (Uece, 2014) e mestrado em Química (área de concentração Química Orgânica) na Universidade Federal do Ceará (UFC, 2017), onde desenvolveu projeto com ênfase na obtenção de metabólitos secundários de fungos endofíticos. Atualmente, é aluna do curso de doutorado em Química da Universidade Federal do Ceará, onde atua em projeto direcionado à identificação de biomarcadores de plantas atacadas por fitopatógenos.

Darlisson de Alexandria Santos

Desenvolveu seu estudo de doutorado no Instituto de Química de São Paulo (IQSC) pela Universidade de São Paulo (USP), tendo como objetivo a produção de celulases por fungos de ambiente marinho para a biodegradação de celulose visando à produção de energia. Tem experiência na área de biocatálise e biotransformação. Atualmente, tem desenvolvido sua pesquisa enquanto professor na Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa) e orientador de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Química da referida instituição.

Davi Dantas Guimarães

Possui licenciatura em Química pela Universidade Federal do Ceará (UFC, 2016) e mestrado em Química pela mesma universidade (2019). Tem experiência na área de química orgânica de produtos naturais, com foco em prospecção química de produtos naturais de micro-organismos, e na identificação de metabólitos secundários que possam ser biomarcadores de fitopatógenos através de espectrometria de massas. Já atuou como docente da rede estadual de ensino, em uma escola de educação profissional (2013). Atualmente, é professor da educação básica, atuando tanto na rede pública como no setor privado de ensino.

Edson Rodrigues Filho (Organizador)

Egresso do Ensino Médio na Escola Estadual de Uberlândia “Museu”, possui licenciatura em Química pela Universidade Federal de Uberlândia (1986), mestrado (1989) e doutorado (1992) em Química

pela Universidade Federal de São Carlos, ambos em Química Orgânica. Pós-doutorado na Universidade de Minnesota (*Plant Pathology*) – EUA. Atualmente, é professor titular da Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, onde atua desde 1992 e onde fundou em 1996 o LaBioMMi – Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-Organismos. Tem experiência na área de química orgânica, com ênfase em química dos produtos naturais, atuando principalmente nos seguintes temas: biossíntese de produtos naturais microbianos; biotransformação; fungos endofíticos, produção de antibióticos e inseticidas a partir de fungos filamentosos e bactérias; sínteses em poucas etapas de moléculas inspiradas em produtos naturais. Especialista nas técnicas analíticas espectrometria de massas, cromatografia e ressonância magnética nuclear.

Eduardo Sousa

Recebeu seu título de doutorado em Química Inorgânica em 2003 pela Universidade Federal do Ceará (UFC), enquanto realizou treinamento em bioquímica e biofísica de metaloproteínas recombinantes na *San Francisco State University* (USA, 2001-2004). Posteriormente, realizou estágio de pós-doutoramento (2004-2008) no Departamento de Bioquímica da *University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas* (USA, 2004-2008), sendo contratado em 2008 como cientista (*research scientist*), investigando heme proteínas sensoras de oxigênio. Permaneceu nessa instituição até 2009, quando foi contratado pela Universidade Federal do Ceará como professor assistente. Foi cientista visitante na *University of Warwick* (UK, 2013-2014) e na Universidade Nova de Lisboa (Portugal, 2019-2020). Entre seus interesses científicos, destacam-se: a investigação de heme proteínas, o desenvolvimento e estudo de reatividade de potenciais metalofármacos, com particular enfoque em agentes antituberculose. Tem experiência nas áreas de química e bioquímica, com ênfase em química de metalofármacos, reatividade química e metaloproteínas recombinantes.

Fátima Miranda Nunes

Possui graduação em Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará (1998), mestrado (2004) e doutorado em Química

Orgânica (2008) pela mesma universidade. Atuou como docente na Universidade Federal do Pará (UFPA), no período de 2009-2012. Tem experiência na área de química, com ênfase em química dos produtos naturais aplicada à biotransformação de produtos naturais, utilizando células íntegras e em crescimento como agentes enzimáticos, e na síntese de moléculas orgânicas. Atualmente, é professora adjunta II do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Francisco Carlos Oliveira

Professor substituto da Universidade Estadual do Ceará (Uece), *campus* Itaperi. Já foi professor substituto do Instituto Federal do Ceará (IFCE), *campus* Ubajara. Possui licenciatura em Química pela Universidade Estadual do Ceará (Uece, 2009). Mestre (2012) e doutor em Química (2017) pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Tem experiência na área de química, com ênfase em química dos produtos naturais, atuando principalmente nos seguintes temas: atividade antimicrobiana, ensino de química, frações alcalóidicas, *Lippia rigida*, isolamento de substâncias orgânicas, fungos endofíticos, HS-SPME/GC-MS e compostos orgânicos voláteis. Tem experiência em ensino das disciplinas Química Inorgânica I, Química Inorgânica II, Química Analítica II, Análise Instrumental, Bioquímica, Laboratório de Química Geral, Laboratório de Química Inorgânica, Química Geral e Orgânica, Química Geral II, Química Analítica I, Estágio Supervisionado no Ensino Fundamental e Estágio Supervisionado no Ensino Médio I.

Francisco das Chagas de Oliveira Freire

Possui graduação em Agronomia pela Universidade Federal do Ceará (1971), mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (1976) e doutorado em Fitopatologia pelo *Imperial College of Science and Tecnology* (1982). Em 1997, concluiu pós-doutorado no *International Mycological Institute* (IMI), em Eghem, Inglaterra. Atualmente, é pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (Embrapa/Fortaleza-CE). Trabalha com taxonomia de fungos (morfologia e

biologia molecular), já tendo descrito 75 novas espécies de fungos, incluindo *Hyphomycetos cercosporoides*, ferrugens, carvões e celomicetos. Especialista em doenças de plantas tropicais.

Francisco Geraldo Barbosa

Possui graduação em Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará (UFC, 1996), mestrado (1999) e doutorado em Química Orgânica (2003) pela mesma universidade. Atualmente, é professor associado II do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC) e membro do Programa de Pós-Graduação em Química da UFC. Tem experiência na área de química orgânica, com ênfase em química de produtos naturais, atuando principalmente nos seguintes temas: isolamento e caracterização estrutural de micromoléculas bioativas, prospecção fitoquímica, semissíntese e biotransformação de compostos bioativos, prospecção fitoquímica, óleos essenciais, biocatálise, prospecção de fungos endofíticos e compostos orgânicos voláteis de micro-organismos (mCOVs).

Francisco Marto Pinto Viana

Engenheiro-agrônomo pela Universidade Federal do Ceará (1978), mestre em Fitossanidade pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (1988) e doutor em Proteção de Plantas – Fitopatologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1996). Pesquisador da Embrapa desde julho de 1989, lotado na Embrapa Agroindústria Tropical desde o ano 2000. Realizou pesquisas em fitopatologia com as culturas da seringueira e do feijoeiro até 1985 na região Norte; trabalhou com doenças de grandes culturas, de hortaliças e de frutíferas até 1996, na região Meio-Norte. Na região Nordeste, tem realizado pesquisas com a indução de resistência de doenças nas culturas do meloeiro e do cajueiro e com patologia pós-colheita de frutas tropicais, além de pesquisas com patologia de árvores florestais.

Jair Mafezoli

Iniciou a carreira acadêmica como professor titular na Universidade de Fortaleza (Unifor), no curso de Farmácia, permanecendo até 2008.

Atualmente, é professor associado do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Graduado em Química (BSc) pela Fundação Universidade Regional de Blumenau, com mestrado em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (orientador: Prof. Dr. Edilberto R. Silveira) e doutorado em Química pela Universidade Federal de São Carlos (orientador: Prof. Dr. Paulo C. Vieira). Com formação acadêmica na área de produtos naturais (mestrado e doutorado), desenvolve pesquisa no Programa de Pós-Graduação em Química da UFC (Capes, nível 6) nas linhas de produtos naturais e biocatálise/biotransformação. Supervisionou várias dissertações e teses, além de iniciação científica. Foi pesquisador do CNPq (nível 2) no período de 2010-2013. Desde 2011, é coordenador do projeto de extensão CluQui, que teve sua criação fomentada pelo CNPq. Realizou estágio de pós-doutorado na Universidade do Arizona (Tucson-AZ, EUA), sob a supervisão do Prof. Dr. Leslie Gunatilaka. Além da formação e atuação acadêmica, possui capacitação em química e acabamento têxtil, com sete anos de experiência em beneficiamento e controle de qualidade na indústria têxtil.

João Evangelista de Ávila

Possui graduação em Química pela Universidade Estadual do Ceará (Uece, 2011) e mestrado em Química pela Universidade Federal do Ceará (UFC, 2015). Tem experiência na área do ensino de química no Ensino Médio.

Josiane Bezerra da Silva Lobão

Licenciada em Química pela Universidade Federal do Ceará (UFC, 2015), obteve em seguida o título de mestre em Química junto ao Programa de Pós-Graduação em Química da mesma universidade (2018), sob a orientação do professor Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa. Ainda em 2018, ingressou no curso de doutorado em Química da UFC. Vem desenvolvendo pesquisas científicas relacionadas à produção, purificação e estudos cromatográficos e espectroscópicos de heme proteínas recombinantes, envolvendo particularmente três proteínas: DevS (*Mycobacterium tuberculosis*), ReFixL (*Rhizobium etli*) e Hell's Gate Globin I (*Methylococcoides burtonii*). Seus interesses

científicos estão centrados em contribuir para elucidar os mecanismos funcionais e estruturais dessas heme proteínas.

Luciana da Silva Amaral

Graduada em Química pela Universidade Federal de São Carlos (2006), mestre em Química Orgânica (2009) e doutora em Ciências, área de concentração Química Orgânica (2014), pela mesma universidade, com período sanduíche na *TU Wien*. Possui experiência na área de química orgânica, com ênfase em produtos naturais microbianos, atuando principalmente no estudo do metabolismo secundário fúngico e biotransformação empregando as técnicas de LC-MS, identificação de micro-organismos por MALDI-TOF, além de biossíntese de produtos naturais com abordagem em manipulação genética e biologia molecular.

Marcos Carlos de Mattos (Organizador)

Bacharel em Química pela Universidade Estadual Paulista (Unesp)/Instituto de Química de Araraquara (1986). Doutor em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo/Instituto de Química da USP (1996). Realizou pós-doutoramento na Universidade de Oviedo-Espanha (2006-2007). Atualmente, é professor titular no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde atua desde outubro de 1997. É um dos responsáveis pelo Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (Labs), desenvolvendo pesquisa na área de síntese orgânica com ênfase em biocatálise.

Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (Organizadora)

Técnica em Química e Acabamento Têxtil pelo Senai/CETIQT (1987), bacharel em Química pela Fundação Universidade da Região de Blumenau (Furb, Blumenau-SC, 1986). Mestre em Química Orgânica (Produtos Naturais) pela Universidade Federal do Ceará (UFC, 1986), doutora em Química (Síntese Orgânica) pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp, 2001). Realizou pós-doutoramento na Universidade do Arizona (Tucson-AZ, EUA, 2013).

Foi professora visitante sênior na Universidade Nacional Australiana (ANU, Camberra, Austrália, 2019). Atualmente, é professora titular no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde atua desde 2002, sendo uma das responsáveis pelo Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (Labs), onde desenvolve pesquisa nas áreas de produtos naturais e biocatálise.

Maria Vieira de Brito

Possui licenciatura em Química pelo Instituto Federal do Piauí (IFPI) e mestrado em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Atualmente, cursa doutorado na UFC, com período “sanduíche” na *Université Toulouse III Paul Sabatier*, França. Possui experiência desenvolvendo pesquisa na área de química de micro-organismos, com ênfase em isolamento de produtos naturais, bem como em sínteses de moléculas orgânicas de interesse biológico.

Marilene Nunes Oliveira

Licenciada em Química (2003) e doutora em Química de Produtos Naturais (2008) pela Universidade Federal do Pará. Pós-doutora pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Atualmente, é professora-pesquisadora associada II da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa) e membro do Programa de Pós-Graduação em Química. Tem experiência na área de química orgânica, com ênfase em química de produtos naturais, atuando principalmente na área de química de micro-organismos.

Mary Anne Sousa Lima

Professora titular do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC). Obteve graduação em Química (1991), mestrado em Química Orgânica (1993) na Universidade Federal do Ceará, doutorado em Química Orgânica na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp, 1999) e pós-doutorado na Universidade da Flórida, EUA (2015). Realiza pesquisas científicas na área de química de produtos naturais, particularmente no estudo químico de plantas e micro-organismos.

Sebastião da Cruz Silva

Possui licenciatura em Química e mestrado em Química Orgânica pela Universidade Federal do Pará, doutorado e pós-doutorado em Química (fungo patogênico) pela Universidade Federal de São Carlos. Atualmente, é professor associado 2 da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. Tem experiência na área de química, com ênfase em química dos produtos naturais, atuando principalmente nos seguintes temas: fungos endofíticos e fungos do solo.

Simone Yasue Simote Silva

Possui bacharelado com Atribuições Tecnológicas (2004), bacharelado em Química (2002), licenciatura em Química (2004) e doutorado em Química pela Universidade Federal de São Carlos (2006) e pós-doutorado pela Unesp/Araraquara em parceria com a indústria farmacêutica Eurofarma. Atualmente, é professora efetiva da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. Tem experiência na área de química, com ênfase em química dos produtos naturais, atuando principalmente nos seguintes temas: plantas da região Norte, biorremediação de espécies vegetais e fungos endofíticos. Atua também na área de ensino.

Taicia Pacheco Fill

Possui bacharelado em Química (2006), mestrado em Química Orgânica (2009) e doutorado em Ciências (Química Orgânica) pela Universidade Federal de São Carlos (2014), com período sanduíche na Universidade de Cambridge, sob supervisão do Prof. Peter Leadlay. Realizou um primeiro pós-doutorado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (2014), sob supervisão do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, e um segundo pós-doutorado no *Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute* (HKI), sob supervisão do Prof. Dr. Christian Hertweck (2017), contemplada com a bolsa *Alexander von Humboldt/Capes*. Atualmente, atua como professora doutora MS-3 no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Unicamp. Em 2019, foi a vencedora na categoria ciências químicas do Prêmio Para Mulheres na Ciência concedido pela Loreal-Unesco-ABC. Desde 2019 é tesoureira

da SBQ regional Campinas e secretária da *ACS chapter Brazil*. Tem experiência na área de química orgânica, com ênfase em química de produtos naturais microbianos, atuando principalmente em biossíntese de metabólitos secundários fúngicos, biologia molecular, manipulação genética e expressão de enzimas microbianas no entendimento de mecanismos biossintéticos.

Ulisses Brigatto Albino

Graduado em Ciências Biológicas e doutorado em Agronomia pela Universidade Estadual de Londrina-UEL (2004). Pós-doutorado em Biologia Evolutiva pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Professor do curso de Licenciatura em Ciências Naturais da Unifesspa (Marabá-PA). Participou de grupos de perícia ambiental e trabalhos de avaliação de segurança em transgênicos junto ao Laboratório de Ecologia Microbiana da UEL. Tem experiência em microbiologia ambiental e soluções em resíduos sólidos.

Visite nosso site:
www.imprensa.ufc.br



[Versão digital](#)

Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará - UFC
Av. da Universidade, 2932 - Benfica
CEP.: 60020-181 - Fortaleza - Ceará - Brasil
Fone: (85) 3366.7485 / 7486
imprensa@proplad.ufc.br

A Universidade Federal do Ceará contribui por excelência para a educação e para a ciência em nosso país. Como um dos seus avanços acadêmicos, merece destaque o desenvolvimento da pós-graduação, que fortalece o pilar da formação de recursos humanos por meio da pesquisa.

A pós-graduação brasileira, sistematicamente avaliada nas últimas décadas, ganha credibilidade, e seus pesquisadores gozam de reconhecimento internacional. Nesse processo, o livro integra a produção intelectual acadêmica das múltiplas áreas que compõem o quadro científico da Universidade e apura os esforços dos pesquisadores que veiculam parte de sua produção nesse formato.

A Coleção de Estudos da Pós-Graduação foi criada, portanto, para apoiar os programas de pós-graduação *stricto sensu* da UFC e consolidar uma política acadêmica, científica e institucional de valorização da pesquisa, ao franquear o curso da produção intelectual em forma de livro.

